



TESIS DE DOCTORADO

**PAPEL DE LOS RECEPTORES
OPIOIDES TIPO κ EN LA
REGULACIÓN DE LA
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA
POR LA NICOTINA**

Laura Liñares Pose

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN ENDOCRINOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2020





DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS
PAPEL DE LOS RECEPTORES OPIOIDES TIPO κ EN LA
REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR LA
NICOTINA

D./Dña. Laura Liñares Pose

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.*
- 5) *No existe conflicto de interés respecto a los datos presentados en esta tesis doctoral.*

En Santiago de Compostela, 15 de junio de 2020.

Fdo. Laura Liñares Pose





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

PAPEL DE LOS RECEPTORES OPIOIDES TIPO κ EN LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR LA NICOTINA

D. Miguel Antonio López Pérez
D. Carlos Diéguez González
Dña. Cristina Contreras Jiménez

INFORMAN:

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

En Santiago de Compostela, 15 de junio de 2020.

Fdo. D. Miguel Antonio López Pérez

Fdo. D. Carlos Diéguez González

Dña. Cristina Contreras Jiménez



Resumo

A ganancia de masa corporal é o principal factor que interfire coa deshabitación tabáquica. A nicotina, o composto bioactivo máis importante do tabaco, demostrou ter un grande impacto tanto no gasto enerxético coma na inxesta, actuando a nivel central. Entre as accións centrais da nicotina sobre a masa corporal, a maioría dos estudos centráronse na termoxénese do tecido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*), mentres que o seu posible efecto termoxénico sobre o tecido adiposo branco (WAT, *white adipose tissue*) quedaba sen esclarecer. Aquí mostramos que a nicotina actúa a nivel central inducendo *browning* no WAT e que este efecto depende do receptor κ opioide (KOR), especificamente na área lateral hipotalámica (LHA). Datos previos demostran que pacientes fumadores presentan unha maior expresión da proteína desacoplante 1 (*uncoupled protein 1*, UCP1) no WAT, e isto é consistente cos nosos resultados. Estes datos demostran que a acción central da nicotina sobre o *browning* no WAT podería ser unha diana contra a obesidade en humanos. **Palabras clave:** *browning*, WAT, nicotina, receptor opioide.

Resumen

La ganancia de masa corporal es el principal factor que interfiere con dejar de fumar. La nicotina, el compuesto bioactivo más importante del tabaco, ha demostrado tener un gran impacto tanto en el gasto energético como en la ingesta, actuando a nivel central. Entre las acciones centrales de la nicotina sobre la masa corporal, la mayoría de los estudios se han centrado sobre la termogénesis del tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*), mientras que su posible efecto termogénico sobre el tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*) permanecía sin esclarecer. Aquí mostramos que la nicotina actúa a nivel central induciendo *browning* en el WAT y que este efecto depende del receptor κ opioide (KOR), específicamente en el área lateral hipotalámica (LHA). Datos previos demuestran que pacientes fumadores presentan una mayor expresión de la proteína desacoplante 1 (*uncoupled protein 1*, UCP1) en el WAT, y esto es consistente con nuestros resultados. Estos datos demuestran que la acción central de la nicotina sobre el *browning* en el WAT podrían ser una diana contra la obesidad en humanos. **Palabras clave:** *browning*, WAT, nicotina, receptor opioide.

Abstract

Body weight gain is a major factor that interferes with smoking cessation. Nicotine, the main bioactive compound in tobacco, has been demonstrated to have an impact on both, energy expenditure and feeding at central level. Most of the brain action of nicotine has been focused on the thermogenesis of the brown adipose tissue (BAT), while its effect on browning of white adipose tissue (WAT) remains unclear. We show that nicotine acting centrally induces the browning of WAT and this effect depends on κ opioid receptor (KOR), specifically in the lateral hypothalamic area (LHA). Previous data showed that smoker patients have higher expression of uncoupling protein 1 (UCP1) expression in the WAT, and this is consistent with our findings. These data demonstrate that central nicotine action on WAT browning could be a target against obesity in humans. **Keywords:** browning, WAT, nicotine, opioid receptor.



ÍNDICE





ÍNDICE.....	11
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
1 Obesidad y homeostasis energética.....	25
1.1 Obesidad.....	25
1.2 Homeostasis energética.....	26
2 Gasto energético y termogénesis.....	29
3 Hipotálamo y regulación de la homeostasis energética.....	33
3.1 Núcleo arcuato.....	35
3.2 Núcleo ventromedial.....	37
3.3 Núcleo dorsomedial.....	39
3.4 Núcleo paraventricular.....	40
3.5 Área lateral hipotalámica.....	41
4 la Nicotina y el balance energético.....	42
4.1 Nicotina.....	42
4.2 Farmacocinética y Farmacodinámica de la nicotina.....	43
4.3 Efectos centrales y periféricos.....	44
5 Receptores Acetilcolinérgicos Nicotínicos.....	45
5.1 Estructura del receptor nicotínico.....	46
5.2 Efectos de la nicotina.....	47
5.3 Experimentación con nicotina.....	47
5.4 Acciones periféricas de la nicotina.....	48
5.5 Acciones centrales e la nicotina.....	49
5.5.1 Modulación de la homeostasis energética.....	49
5.5.2 Modulación del sistema hedónico.....	50
5.5.3 Plasticidad neuronal.....	51
6 Receptor Opiode.....	51
6.1 Tipos de receptores.....	51
6.2 Receptor κ opioide.....	52
OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
7 Muestras humanas.....	61
8 Modelos animales.....	63
8.1 Legislación.....	63
8.2 Modelos animales.....	63
9 Anestesia y analgesia.....	64
10 Vías de administración de sustancias.....	65

10.1	Vía subcutánea (SC).....	65
10.2	Vía Intraperitoneal (IP).....	65
10.3	Vía hipotalámica núcleo-específica.....	65
10.4	Vía intracerebroventricular (ICV).....	66
11	Procedimientos no quirúrgicos.....	66
11.1	Monitorización de la ingesta y de la masa corporal.....	66
11.2	Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora	66
11.3	Determinación de la composición corporal.....	67
11.4	Preparación de mini bombas osmóticas.....	67
12	Procedimientos quirúrgicos.....	67
12.1	Canulación Intracerebroventricular.....	67
12.2	Estereotaxia núcleo-específica.....	68
12.3	Registro de la actividad simpática.....	68
12.4	Disección y extracción de tejidos.....	69
13	Diseños experimentales.....	69
13.1	Tratamiento con nicotina SC en ratas.....	69
13.2	Tratamiento con nicotina central ICV en ratones.....	70
13.3	Tratamiento con nicotina en bombas SC en ratones KOR KO.....	70
13.4	Tratamiento con AAVs para silenciar Opkr1 en rata en VMH y LHA.....	71
14	Técnicas analíticas.....	72
14.1	Análisis de proteínas por western blot.....	72
14.1.1	Extracción de proteína.....	72
14.1.2	Cuantificación de proteína.....	73
14.1.3	Western blot.....	73
14.2	Análisis de ARN mensajero por PCR en tiempo real.....	78
14.3	Inmunohistoquímica.....	81
14.4	Histología.....	81
15	Estadística.....	82
15.1	Test paramétricos.....	82
15.1.1	ANOVA de una vía.....	82
15.1.2	T-test.....	83
15.2	Correlación Bivariante.....	83
	RESULTADOS.....	85
1.	La nicotina periférica induce <i>browning</i> en el WAT.....	87
2.	La nicotina central induce <i>browning</i> en el WAT.....	89
3.	El KOR es necesario para la acción de la nicotina sobre el balance energético.....	96
4.	El KOR en el LHA media la acción de la nicotina sobre el balance energético.....	101

5. UCP1 en el WAT correlaciona positivamente con el consumo de nicotina en humanos 109

DISCUSIÓN.....	113
CONCLUSIONES.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXO 1	163





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAVs: virus adeno-asociado, *adeno-associated virus*.

AC: adenilato ciclasa, *adenylate cyclase*.

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

AMPc: adenosín monofosfato cíclico.

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

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

AP: anteroposterior.

ARC: núcleo arcuato, *arcuate nucleus*.

ARNm: ARN mensajero, *messenger RNA*.

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

BAT: tejido adiposo pardo.

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

BHE: barrera hematoencefálica.

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

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

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

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

Cbln1: cerebelin 1, *cerebellin 1*.

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

CKK: colecistoquinina, *cholecystokinin*.

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

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

DA: dopamina.

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

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético, *3,4-dihydroxyphenilacetic acid*.

DOR: receptor δ opioide, *δ opioid receptor*.

DV: dorsoventral.

EE: gasto energético, *energy expenditure*.

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

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

FMO3: trimetilamina monooxigenasa, *flavin-containing monooxygenase 3*.

GABA: ácido γ -aminobutírico, *γ -aminobutyric acid*.

GABA_{AR}: receptor de ácido γ -aminobutírico, *γ -aminobutyric acid receptor*.

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

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

GRP78: proteína regulada por glucosa 78, *glucose regulated protein 78*.

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

HCV: virus de la hepatitis C, *hepatitis C virus*.

HT: hormonas tiroideas.

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

5-HT: serotonina, 5-hidroxitriptamina.

ICH: inmunohistoquímica, *immunohistochemistry*.

ICV: intracerebroventricular.

IMC: índice de masa corporal.

IO: oliva inferior, *inferior olive*.

IP: intraperitoneal.

IR: receptor de insulina, *insulin receptor*.

KOR: receptor κ opioide, *κ opioid receptor*.

KOR KO: receptor κ opioide knock-out, *knock-out κ opioid receptor*.

L: lateral.

LA: actividad locomotora, *locomotor activity*.

LepR: receptor de leptina, *leptin receptors*.

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

LPL: lipoproteína lipasa, *lipoprotein lipase*.

MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno, *mitogen-activated protein kinase*.

MC3R y MC4R: receptors de melanocortinas 3 y 4, *melanocortin receptors 3 and 4*.

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

ME: eminencia media, *median eminence*.

MGL: monoacilglicerol lipasa, *monoacylglycerol lipase*.

MOR: receptor μ opioide, *μ opioid receptor*.

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

- nAChR: receptor acetilcolinérgico nicotínico, *nicotinic acetylcholine receptor*.
- NE: norepinefrina, *norepinephrine*.
- NEFA: ácidos grasos libres no-esterificados, *nonesterified free fatty acids*.
- 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*.
- NTS: núcleo del tracto solitario, *nucleus of solitary tract*.
- OMS: organización mundial de la salud.
- OX: orexina, *orexin*.
- OXM: oxintomodulina, *oxintomodulin*.
- OX1R y OX2R: receptores de orexina 1 y 2, *orexin receptor 1 and 2*.
- p38 MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno p38, *p38 mitogen-activated protein kinase*.
- PACAP: polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*.
- 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*.
- PKA: protein kinasa A, *protein kinase A*.
- POA: área preóptica, *preoptic area*.
- POMC: proopiomelanocortina, *proopiomelanocortin*.
- PPAR γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*.
- PR: receptor de progesterona, *progesteron receptor*.
- PRDM16: dominio PR que contiene 16, *PR domain containing 16*.
- PVH: núcleo paraventricular, *paraventricular nucleus of the hypothalamus*.
- PYY: péptido YY3-36, *Peptide YY (PYY)₃₋₃₆*.
- RA- β 3: receptores adrenérgicos β 3.

RE: retículo endoplásmico.

RIP140: proteína de interacción con receptores 140, *receptor-interacting protein 140*.

RPa: rafe pálido, *raphe pallidus*.

RQ: coeficiente respiratorio, *respiratory quotient*.

SC: subcutáneo.

SD: dieta estándar, *standard diet*.

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

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

shRNA: ARN de horquilla corta, *short hairpin RNA*.

SNC: sistema nervioso central.

SNPS: sistema nervioso parasimpático.

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

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

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

TG: triacilglicerol, *triacilglycerol*.

TH: tiroxín hidroxilasa.

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

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

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

VTA: área ventral tegmental, *ventral tegmental area*.

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

WAT: tejido adiposo blanco.

ANGLICISMOS

Browning: pardeamiento

Downstream: más abajo (*referido a una vía de señalización*)

Knockout

Upstream: más arriba (*referido a una vía de señalización*)

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 de la Salud (OMS) define la obesidad y el sobrepeso como una acumulación excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (Salud, 2018). De manera general, se utiliza el índice de masa corporal (IMC) como indicador de sobrepeso y obesidad en adultos, mediante una relación entre la masa (kg) y la talla (m) del individuo elevada al cuadrado ($IMC = \text{kg}/\text{m}^2$). Un adulto con un peso normal debería tener un IMC entre 18,5 y 24,9. Un IMC igual o superior a 25 se considera sobrepeso, mientras que un índice igual o superior a 30 se considera obesidad. Dentro del sobrepeso y la obesidad existen distintos grados como aparecen detallados en la (Tabla 1) ((SEEDO)).

Tabla 1. Clasificación según el IMC.

Clasificación	IMC
Peso insuficiente	<18,5
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado I	25-26,9
Sobrepeso grado II (preobeso)	27-29,9
Obesidad tipo I	30-34,9
Obesidad tipo II	35-39,9
Obesidad tipo III (mórbida)	40-49,9
Obesidad tipo IV (extrema)	>50

La obesidad se asocia con un grupo de desórdenes metabólicos como la hipertensión, la dislipidemia, la hipertriacilgliceridemia, la resistencia a insulina y la inflamación, entre otros. La combinación de varias de estas alteraciones, suponen un estado muy asociado a la obesidad, denominado síndrome metabólico. Tanto la obesidad como el síndrome metabólico son factores de riesgo para el desarrollo de diabetes, enfermedades cardiovasculares, y ciertos tipos de cáncer (Salud, 2018).

La obesidad se produce por un desequilibrio en el balance energético en el que la cantidad de energía consumida supera al gasto energético. El exceso de ingesta de alimentos con un alto contenido energético y un tipo de vida cada vez más sedentario, han dado lugar a un aumento en la incidencia de obesidad, independientemente del nivel de desarrollo de los países o su renta per cápita (Berthoud & Morrison, 2008). Actualmente, se considera que la obesidad ha alcanzado proporciones pandémicas. Desde 1975 la prevalencia de la obesidad se ha triplicado en todo el mundo y cada año unos 2,8 millones de personas mueren debido al sobrepeso o la obesidad (Salud, 2017). En 2016, el 39% de los adultos tenían sobrepeso y, en general, un 13% de la población adulta mundial era obesa según datos de la OMS (Salud, 2018). Otro dato alarmante es que la mayor parte de la población del mundo reside en países donde la causa de muerte por obesidad o sobrepeso es superior a la ocasionada por desnutrición (Salud, 2018). Asimismo, la obesidad infantil se ha convertido en un grave problema de salud pública. En 2016 la prevalencia de sobrepeso y obesidad en todo el mundo

ha pasado a ser del 18% en niños y adolescentes, con un porcentaje similar en ambos sexos. La obesidad en la población infantil se asocia con una mayor probabilidad de obesidad en la edad adulta, muerte prematura y discapacidad. Además de estos riesgos en el futuro, los niños obesos sufren dificultades respiratorias, mayor riesgo de fracturas e hipertensión y presentan marcadores tempranos de enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina y efectos psicológicos (Salud, 2018).

En España no escapamos a esta tendencia. Un 62% de la población mayor de 20 años tenía sobrepeso y casi un 27% era obesa según datos estimados del 2008. Comparando entre los dos sexos, el sobrepeso se mostró más prevalente en hombres, con un 67,7%, que en mujeres, con un 56,6%; mientras los datos de obesidad recogidos fueron muy similares, con un 26,5% y un 26,7%, respectivamente. En cuanto a la población infantil, datos del año escolar 2009/2010 revelaron que entre los 6 y los 9 años existen un 44,5% de niños y niñas con sobrepeso y un 18,3% con obesidad (Salud, 2013).

El tejido adiposo blanco, es un órgano especializado en la acumulación del exceso de energía en forma de grasa, para ser utilizada en situaciones de carencia nutricional. Sin embargo, en situaciones de obesidad, la grasa puede acumularse de manera patológica en otros órganos y tejidos, donde ejerce efectos nocivos, lo que se conoce como lipotoxicidad. 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 (Clemmensen et al., 2017; Cui, Lopez, & Rahmouni, 2017; Lopez & Tena-Sempere, 2017; Schneeberger, Gomis, & Claret, 2014; Tschop et al., 2016). La resistencia a insulina, la diabetes tipo 2, la enfermedad del hígado graso, los eventos cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, los cuáles se asocian con estados de obesidad, suponen un enorme gasto sanitario en los países desarrollados. Por esta razón, se está poniendo un gran esfuerzo en la identificación de los mecanismos moleculares que controlan la homeostasis energética (Salud, 2018).

1.2 HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

La supervivencia de un organismo se basa en una estricta regulación de la homeostasis energética. Para garantizarla, el balance energético tiene que estar en equilibrio, esto es igualar el aporte y el gasto de energía. Las variaciones en la masa corporal de un individuo son el resultado de alteraciones entre su ingesta y su gasto energético. Existen distintos aspectos que pueden afectar a este equilibrio, como las características fisiológicas intraindividuales, el sexo, la edad, el ambiente y el estilo de vida (Eissele et al., 1992; J. M. Friedman, 2009; Kopelman, 2000). El aporte energético responde a la ingesta de alimentos y bebidas, mientras que el gasto energético está compuesto por la tasa metabólica basal, la termogénesis y la actividad física (Imagen 1). Si se ingieren menos calorías de las que se gastan, el balance energético será negativo; si esto se produce de forma continuada se genera delgadez. Si por el contrario, el aporte calórico es superior a la energía que se consume el balance sería positivo, dando lugar a una situación de sobrepeso u obesidad (Leibel, Rosenbaum, & Hirsch, 1995; Ravussin, Leibel, & Ferrante, 2014; Sims et al., 1973).

BALANCE ENERGÉTICO

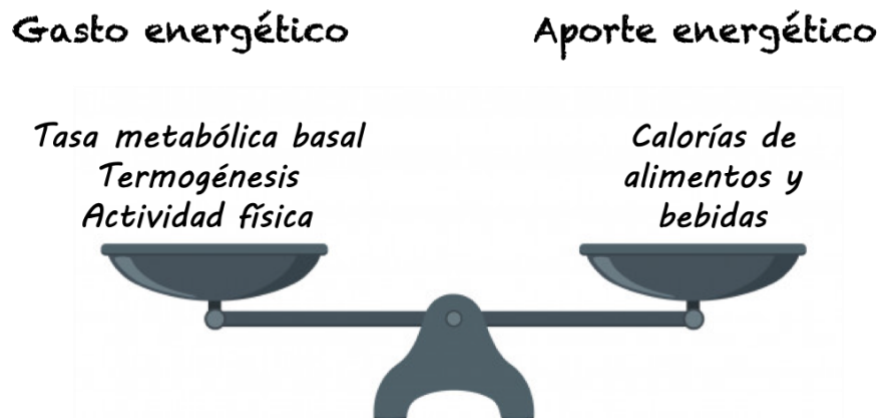


Imagen 1. Componentes del balance energético.

La ingesta de alimentos es una conducta compleja que implica tanto al instinto de supervivencia como a mecanismos de recompensa. Áreas primarias, como el hipotálamo o centros del troncoencéfalo están implicados en el control de la ingesta, pero también otras áreas superiores van a influir en nuestra alimentación 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 (Dietrich & Horvath, 2009).

El hipotálamo es una región del encéfalo que regula la homeostasis energética mediante la detección propia de nutrientes y la integración de hormonas periféricas, de señales neuronales de saciedad y del estado nutricional del organismo. Ante ellas, es capaz de generar una respuesta conductual, autónoma y/o endocrina (Dieguez, Fruhbeck, & Lopez, 2009; Spiegelman & Flier, 2001; Yeo & Heisler, 2012). Dentro del hipotálamo el núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*) actúa como el principal regulador de la ingesta, ya que se ha visto que cuando se lesiona específicamente este núcleo en ratones se produce hiperfagia y obesidad (Olney, 1969). En función del tipo de respuesta que se genere, en el ARC se expresan neuropéptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide Y*) y péptido relacionado con agutí (AgRP, *agouti-related peptide*), que estimulan la ingesta de alimentos, y también neuropéptidos anorexigénicos como la proopiomelanocortina (POMC, *proopiomelanocortin*) y el transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART, *cocaine- and amphetamine-regulated transcript*), que la inhiben (Bouret, Draper, & Simerly, 2004; Coppari, Ramadori, & Elmquist, 2009; Hill, Elmquist, & Elias, 2008; Lopez, Lelliott, & Vidal-Puig, 2007). Pero el hipotálamo no sólo actúa en la ingesta de comida y el gasto energético, sino que también influye en la utilización de los nutrientes, la homeostasis de la glucosa y el metabolismo periférico de lípidos (L. M. Williams, 2012).

El hipotálamo integra señales procedentes de la periferia que informan de la situación energética del organismo. Estas señales pueden tener varias procedencias: de órganos endocrinos, del tejido adiposo y también, del tracto gastrointestinal como son los nutrientes provenientes de la dieta. (Yeo & Heisler, 2012). Las señales provenientes del tejido adiposo, conocidas también como señales de adiposidad, responden a la cantidad de grasa que posee el organismo (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000). La leptina es una hormona

sintetizada en los adipocitos que disminuye la ingesta y restaura la glucemia (J. Friedman, 2016; Goldstone, 2006; Morris & Rui, 2009; Y. Zhang et al., 1994). Por otro lado, las señales de saciedad comprenden a aquellas sustancias secretadas en respuesta al contenido de nutrientes de la dieta. La insulina es una hormona sintetizada por el páncreas en respuesta a altos niveles de glucosa en sangre, cuya función es la de promover la captación de glucosa por los tejidos (Banting, Best, Collip, Campbell, & Fletcher, 1922; Saltiel & Kahn, 2001; Saltiel & Pessin, 2002). Además, la entrada de alimentos en el organismo provoca que se originen señales de saciedad a nivel gastrointestinal como la colecistoquinina (CKK, *cholecystokinin*), liberada por las células I del duodeno en respuesta a la presencia de aminoácidos y grasas (Geary, Smith, & Corp, 1996; Kissileff, Carretta, Geliebter, & Pi-Sunyer, 2003; Moran & Kinzig, 2004), el péptido YY3-36 (PYY, *Peptide YY*, (*PYY*)₃₋₃₆) (Batterham et al., 2002), la oxintomodulina (OXM, *oxintomodulin*) (Batterham et al., 2002; Dakin et al., 2001; Dakin et al., 2004) y el péptido análogo de glucagón 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*), concretamente en las células del intestino (Murphy & Bloom, 2006). Por otro lado, la ghrelina es la única hormona procedente del estómago secretada durante estados de ayuno, que estimulada la ingesta (Currie, Mirza, Fuld, Park, & Vasselli, 2005; Kageyama, Takenoya, Shiba, & Shioda, 2010; Lopez et al., 2008; Murphy & Bloom, 2006). Todas estas señales tienen en común que pueden alcanzar el cerebro atravesando la barrera hematoencefálica (BHE), llegando al hipotálamo, donde van a ser integradas para generar una respuesta de regulación del metabolismo energético (Imagen 2).

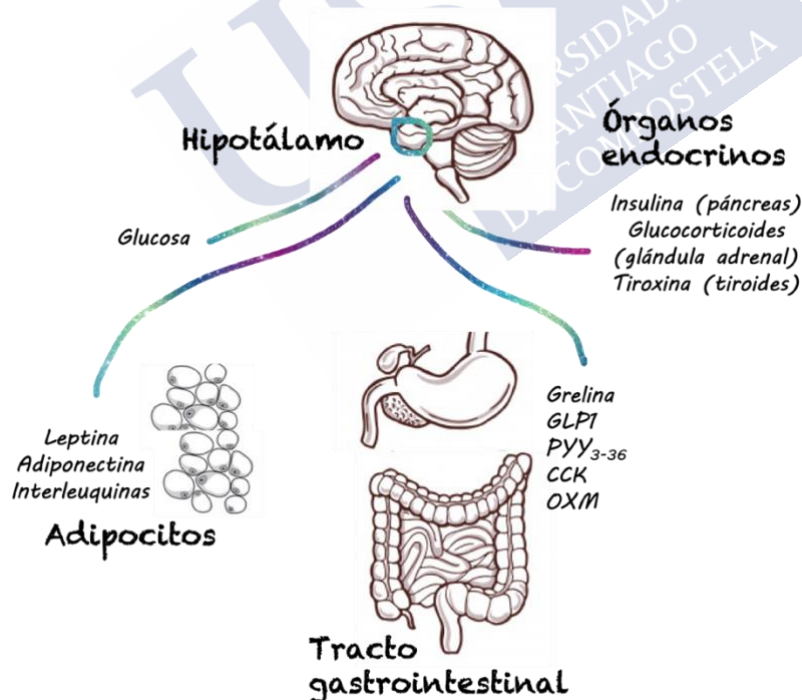


Imagen 2. Integración a nivel central de hormonas derivadas del tracto gastrointestinal, el tejido adiposo y órganos endocrinos.

2 GASTO ENERGÉTICO Y TERMOGÉNESIS

El gasto energético (EE, *energy expenditure*) está compuesto por distintos factores: la tasa metabólica basal, la termogénesis y la actividad física. La termogénesis es esencial para mantener la temperatura en los organismos homeotermos y el tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*) es el principal tejido responsable de la termogénesis, ya que está especializado en la producción de calor (Cannon & Nedergaard, 2004). Se pueden diferenciar dos tipos de termogénesis: Una es la termogénesis obligatoria, definida como la energía disipada por un individuo en reposo en condiciones de termoneutralidad, la cual está vinculada con la realización de las reacciones metabólicas esenciales del organismo. La otra es la termogénesis adaptativa, que engloba la energía disipada por el movimiento del músculo esquelético tiritando o por el calor generado por el tejido adiposo pardo (Lowell & Bachman, 2003; Lowell & Spiegelman, 2000).

La termogénesis del BAT es muy importante en pequeños mamíferos, ya que les permite generar calor de forma independiente de la termogénesis por temblor, derivada del movimiento de los músculos (Cannon & Nedergaard, 2004; Labbe et al., 2015). En los roedores el BAT se localiza en la región interescapular, subescapular, perirrenal, axilar y periaórtica (Cannon & Nedergaard, 2004). En este tipo de animales se estima de forma teórica que la termogénesis puede aumentar el EE diario hasta un 20% más (Contreras et al., 2015; Cypess & Kahn, 2010). Hasta no hace muchos años, el BAT se consideraba un tejido sólo relevante en mamíferos hibernantes, roedores y humanos recién nacidos (Cannon & Nedergaard, 2004; Lowell & Spiegelman, 2000; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Whittle, Lopez, & Vidal-Puig, 2011). Sin embargo, en la última década se ha localizado BAT funcional en adultos humanos mediante tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (PET-CT, *positron emission tomography-computed tomography*) (Cypess et al., 2009; Nedergaard, Bengtsson, & Cannon, 2007; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; J. Wu et al., 2012). Las áreas en las que se observó su presencia estaban dispersas, pero bien definidas, principalmente en la zona supraclavicular, el cuello, áreas intercostales, región perirrenal y periaórtica (Cypess et al., 2009; Nedergaard et al., 2007; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009). A pesar de este gran descubrimiento, se ha visto en publicaciones más recientes, que el BAT en humanos muestra un perfil de expresión de biomarcadores más similar al de los adipocitos beige que al de los adipocitos marrones característicos del BAT, a partir de biopsias del tejido de la zona supraclavicular (Jespersen et al., 2013; J. Wu et al., 2012). Los adipocitos beige son células que se encuentran en el tejido adiposo blanco (WAT, *white adipose tissue*) y que sufren un proceso de diferenciación distinto al de los adipocitos blancos mediante el proceso de *browning* que será detallado a continuación. Finalmente se ha estimado que un BAT totalmente activado en humanos contribuye en un 5% a la tasa metabólica basal (van Marken Lichtenbelt & Schrauwen, 2011).

Los adipocitos del BAT se conocen como adipocitos marrones y tienen características anatómicas y funcionales opuestas a los adipocitos blancos del WAT (Imagen 3). Así, los adipocitos marrones, son de pequeño tamaño, y presentan una forma poligonal con numerosas gotas lipídicas multiloculares rodeadas de un elevado número de mitocondrias (Lim et al., 2012), que en su interior contienen citocromos con hierro responsables de la coloración

marrón característica del BAT. Por otra parte, los adipocitos blancos son depósitos de grasa con una presencia muy baja de mitocondrias y una gran gota lipídica en el interior de las células para almacenar el exceso calórico del organismo, teniendo gran tamaño celular. No sólo existen diferencias morfológicas entre los adipocitos blancos y los marrones, sino que se ha observado que también proceden de células precursoras distintas, ya que antes de su diferenciación expresan genes diferentes (Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014; Seale et al., 2008; Shan et al., 2013; Timmons et al., 2007; Tseng et al., 2008). Ambos tejidos se encuentran inervados por fibras nerviosas del sistema nervioso simpático (SNS, *sympathetic nervous system*) (Cannon & Nedergaard, 2004; Granneman, 1988; Villarroya & Vidal-Puig, 2013; Whittle et al., 2011; Zingaretti et al., 2009) que permiten el control de la termogénesis desde áreas centrales mediado por los receptores adrenérgicos β_3 (RA- β_3) (Bartness, Liu, Shrestha, & Ryu, 2014; Bartness, Vaughan, & Song, 2010; Cannon & Nedergaard, 2004; Zeng et al., 2015). Cuando llega la señal a través del SNS se produce una liberación de norepinefrina (NE) en sus terminales y ésta se une a los RA- β_3 , los cuales activan la lipólisis en el WAT y también la termogénesis en los adipocitos beige y en los adipocitos marrones, tanto en roedores como en humanos (Bartness et al., 2014; Bartness et al., 2010; Cypess et al., 2015; Zeng et al., 2015). De forma contraria, si se administra de forma subcutánea un antagonista de estos receptores, se inhibe la termogénesis en el WAT y el BAT (Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Lopez et al., 2010; Martinez de Morentin et al., 2014).

En respuesta a varios estímulos, como la activación del SNS o el frío, del mismo modo que en el BAT, en el WAT pueden aparecer adipocitos con características similares a los adipocitos marrones en un proceso conocido como “*beiging*” o “*browning*”, que podría traducirse al castellano como “pardeamiento” (J. Wu et al., 2012). En cuanto a la termogénesis, los adipocitos beige presentan las mismas propiedades que el BAT (Contreras et al., 2015; Lee, Werner, Kebebew, & Celi, 2014; Petrovic et al., 2010), aunque su capacidad termogénica *in vivo* es menor que la de los adipocitos marrones (Keipert & Jastroch, 2014; Nedergaard & Cannon, 2013; Shabalina et al., 2013; Walden, Hansen, Timmons, Cannon, & Nedergaard, 2012). Su inducción tras la activación de los RA- β_3 evidencia que el SNS es responsable de su activación, al igual que sucede con el BAT (Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015; Contreras, Nogueiras, Dieguez, Medina-Gomez, & Lopez, 2016; Lage, Ferno, Nogueiras, Dieguez, & Lopez, 2016; Magnan, Levin, & Luquet, 2015).

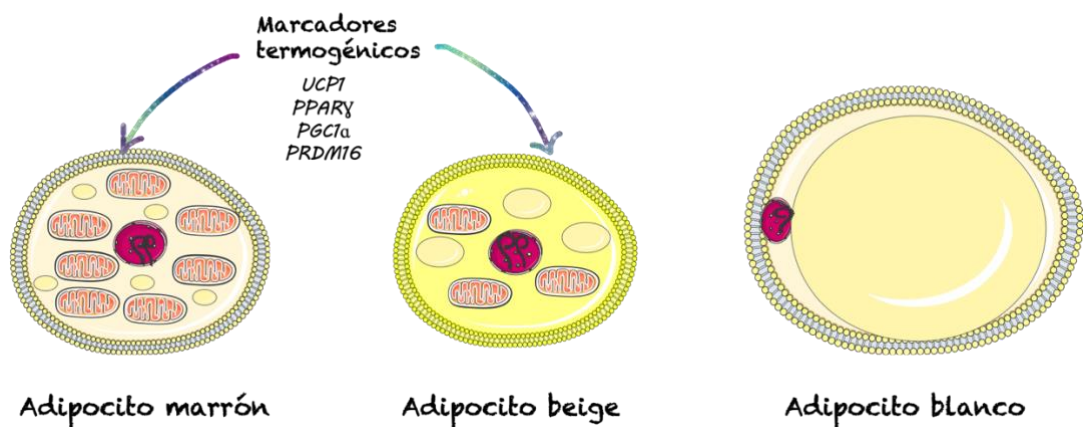


Imagen 3. Adipocitos marrones, beige y blancos.

Existen determinados factores que son imprescindibles para que se produzca el fenómeno de *browning*. Los más importantes son el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ , *proliferator-activated receptor gamma*), el dominio PR que contiene 16 (PRDM16, *PR domain containing 16*) y la proteína 1 alfa coactivadora del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α , *proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*), los cuales se emplean también junto con la proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*) como marcadores del aumento de termogénesis en el BAT o en el WAT a causa del *browning* (Contreras et al., 2015). PPAR γ es un factor de transcripción que interviene en la supervivencia de los adipocitos blancos y marrones (Ohno, Shinoda, Spiegelman, & Kajimura, 2012; Petrovic et al., 2010; Spiegelman, Puigserver, & Wu, 2000; Tiraby et al., 2003; Uldry et al., 2006), y la inducción de genes propios de los adipocitos marrones en el WAT está mediada por la activación de PRDM16 (Ohno et al., 2012). Debido a esto PRDM16 también resulta esencial para inducir la formación de adipocitos marrones en el WAT (Ohno et al., 2012; Seale, 2010; Seale et al., 2008; Seale, Kajimura, & Spiegelman, 2009). En cuanto a PGC1 α , no es esencial para la diferenciación de los adipocitos marrones, pero sí lo es para el correcto funcionamiento de la termogénesis, ya que controla factores que afectan a la biogénesis mitocondrial (Puigserver et al., 1998; Uldry et al., 2006; Z. Wu et al., 1999). Todos estos factores están muy relacionados entre sí, ya que para que se produzca una sobreexpresión de genes propios del BAT por la acción de PRDM16, tanto PGC1 α como la proteína 1 beta coactivadora del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 β , *proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 beta*) son necesarios (Kajimura et al., 2008), y ambos resultan ser también coactivadores de PPAR γ (Ohno et al., 2012; J. Wu et al., 2012). Por otro lado, realizando una función opuesta, está la proteína de interacción con receptores nucleares 1 (RIP140, *receptor-interacting protein 140*), un receptor de localización nuclear (Christian, White, & Parker, 2006) cuya sobreexpresión inhibe genes implicados en biogénesis mitocondrial y metabolismo oxidativo implicados en la termogénesis (Christian et al., 2005; Leonardsson et al., 2004; Powelka et al., 2006). La eliminación de RIP140 en el WAT estimula la formación de adipocitos de tipo marrón y el *browning* (Leonardsson et al., 2004).

El BAT también está regulado por hormonas periféricas de forma directa, a parte de su acción central, como las hormonas tiroideas (HT). Los receptores de HT se encuentran altamente expresados en el BAT y por ello las HT ejercen su acción directamente sobre este tejido, de forma sinérgica con la NE, que actúa sobre sus respectivos receptores. (Bianco, Sheng, & Silva, 1988; Lopez & Tena-Sempere, 2017; Silva, 2006).

Tanto los mecanismos a nivel central como a nivel periférico pueden modular la actividad del BAT, siendo fundamental en ambos el SNS. Cuando aumenta el tono simpático que inerva el BAT se produce la liberación de NE en las terminaciones nerviosas y se activan los receptores β 3-adrenérgicos en los adipocitos marrones. Este tipo de receptores están acoplados a proteínas G, que activan a la adenilato ciclasa (AC, *adenylate cyclase*), provocando una elevación del adenosín monofosfato cíclico (AMPc). El cAMP, a su vez, activa la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*), activando la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) (Cannon & Nedergaard, 2004; W. Cao, Medvedev, Daniel, & Collins, 2001; Contreras et al., 2015). La activación de PKA incrementa la actividad de la lipasa sensible a hormona (HSL, *hormone sensitive lipase*) y de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), que se encargan de proporcionar el sustrato necesario para las numerosas mitocondrias de este tejido (Cannon &

Nedergaard, 2004). De este modo, las mitocondrias emplean los triacilglicéridos resultantes de la acción de las lipasas como sustrato energético, gracias a la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a *carnitine palmitoyltransferase 1a*) que introduce en la mitocondria los ácidos grasos libres no-esterificados citosólicos (NEFA, *nonesterified free fatty acids*), que se van a oxidar y a dar lugar a NADH y FADH. Estos, a su vez, se oxidan en la cadena de transporte electrónico (Imagen 4) (Clifford, Londos, Kraemer, Vernon, & Yeaman, 2000; Contreras et al., 2015; Holm, Fredrikson, Cannon, & Belfrage, 1987; Morimoto, Kameda, Tsujita, & Okuda, 2001; Shih & Taberner, 1995) para disipar calor a través de UCP1, localizada en la membrana interna mitocondrial, que se encarga de generar un gradiente de electrones hacia la matriz mitocondrial, desacoplando la cadena respiratoria de la generación de energía en forma de ATP; dicho exceso de energía se disipa en forma de calor (Cannon & Nedergaard, 2004; Nicholls & Locke, 1984; Silva, 2006).

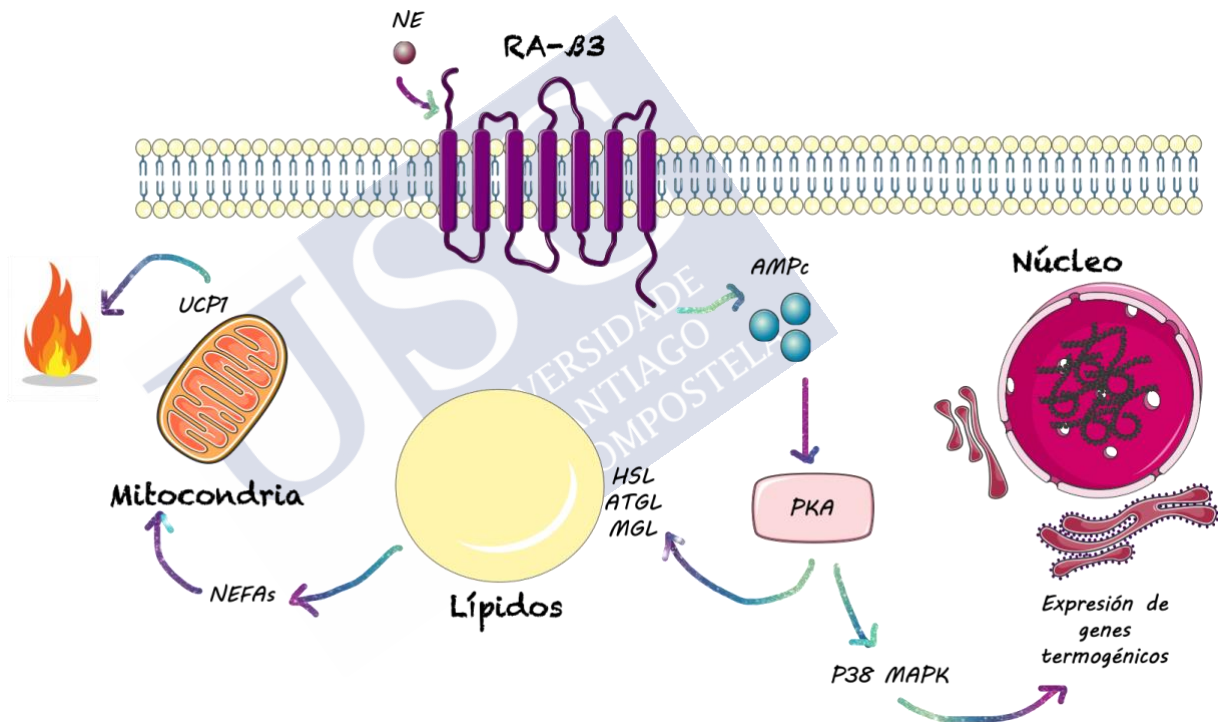


Imagen 4. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT.

La PKA puede tener efectos agudos o crónicos sobre el BAT. Así, de manera aguda, la PKA incrementa la lipólisis y se deben a la activación de la ATGL, la monoacilglicerol lipasa (MGL, *monoacylglycerol lipase*) y la HSL, cuya forma activada es pHSL, que hidrolizan los triacilgliceroles (TG, *triacylglycerol*), para liberar NEFA. Por otra parte, la activación crónica de la PKA induce la biogénesis mitocondrial, la hiperplasia e hipertrofia del BAT y el aumento de la expresión de UCP1, efectos que están mediados por la activación de las proteínas quinasa del mitógeno activado p38 (p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase) (Cannon & Nedergaard, 2004; W. Cao et al., 2001).

Recientemente se ha cuestionado este modelo por no explicar completamente el mecanismo de activación de la termogénesis. En el modelo estándar, UCP1 está inactivo debido a la unión a ADP y ATP, y esta inhibición se anula por los NEFA que se liberan de la gota lipídica por la acción de la ATGL. Ciertos estudios han demostrado que aún en ausencia de ATGL, o de enzimas activadas por ésta, la termogénesis ocurre porque el BAT tiene capacidad para captar NEFA liberadas por el WAT (Schreiber et al., 2017; Shin et al., 2017) que son sustrato y también activadores de UCP1, sugiriendo que el SNS no está implicado en esta vía de activación de la termogénesis. Por ello, se ha postulado la existencia de un activador de UCP1, diferente de los ácidos grasos, inducido por NE que permite que los NEFA externos puedan ser empleados en la termogénesis (Cannon & Nedergaard, 2017).

Debido a su gran capacidad para usar lípidos como fuente energética, el BAT, no sólo incrementa el gasto de energía, también reduce las concentraciones de TG y glucosa del plasma (Bartelt et al., 2011; Guerra et al., 2001; Gunawardana & Piston, 2012) debido a su captación y eliminación de grandes cantidades de glucosa y lípidos de la circulación para usarlos como sustrato en la termogénesis (Bartelt et al., 2011; Cannon & Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2015; Meyer et al., 2010).

3 HIPOTÁLAMO Y REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El hipotálamo es una región del encéfalo que desempeña un papel fundamental en la integración de las señales aferentes que llegan al SNC y activa respuestas autonómicas, endocrinas y conductuales (Saper & Lowell, 2014). Está situado bajo el tálamo, abarcando la mayor parte del diencefalo ventral y es un área especializada formada por varios núcleos, o agrupaciones de neuronas que contiene circuitos neuronales altamente conservados que controlan las funciones básicas de la vida. Entre ellas se incluyen el control endocrino, el metabolismo energético (Lopez et al., 2007; Saper & Lowell, 2014), el balance hídrico y electrolítico, la termorregulación, los ciclos de vigilia-sueño, las respuestas a estrés del medio ambiente y la reproducción (Saper & Lowell, 2014; G. Williams et al., 2001).

El hipotálamo puede dividirse en tres zonas. El área preóptica, que contiene circuitos que integran funciones como la termorregulación, el equilibrio electrolítico, la fiebre, la vigilia-sueño, los ritmos circadianos y la reproducción. La parte media o área tuberal posee un circuito integrador para la termorregulación y la ingesta, y cuenta con circuitos de salida para el comportamiento sexual, la agresividad y muchas respuestas endocrinas y autónomas. La parte posterior, o área posterior, genera salidas al sistema de excitación del hipocampo, que se cree que son importantes en la regulación de la vigilia y las respuestas al estrés (Saper & Lowell, 2014) (Imagen 5).

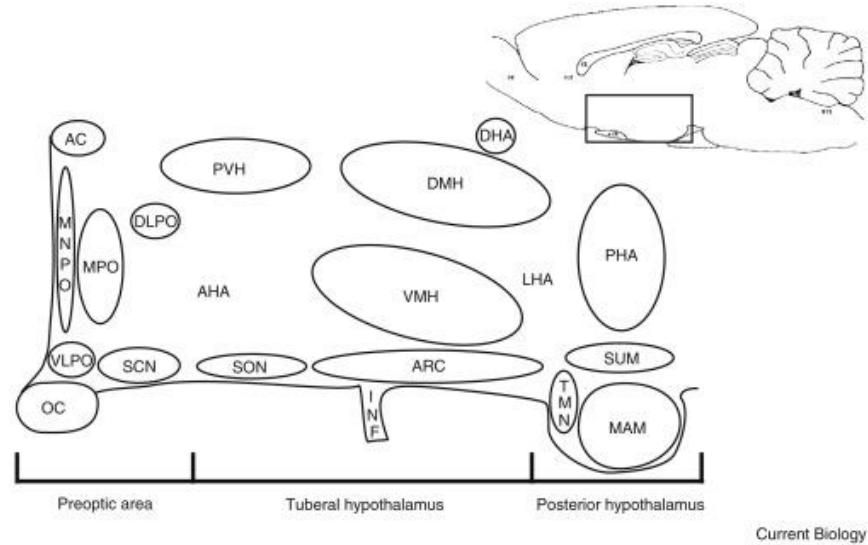


Imagen 5. Distribución de los distintos núcleos hipotalámicos (Saper & Lowell, 2014). Imagen reproducida con permiso de Elsevier.

El hipotálamo, principal centro regulador del balance energético, está dividido en agrupaciones neuronales interconectados entre sí, llamados núcleos hipotalámicos. Algunos de ellos están íntimamente implicados en la regulación de la termogénesis. Así, el área preóptica (POA, *preoptic area*) es el principal núcleo sensor de temperatura en el SNC, ya que recibe información central y periférica de neuronas sensibles a la temperatura y genera una respuesta para regular la temperatura corporal respecto al ambiente externo (Boulant, 2000; Fuller, Horwitz, & Horowitz, 1975; Guieu & Hardy, 1970; Imai-Matsumura, Matsumura, & Nakayama, 1984; Nakamura, 2011). El POA está conectado de forma directa con el núcleo ventromedial (VMH, *ventromedial nucleus of the hypothalamus*) y activa la termogénesis del BAT en respuesta a bajas temperaturas (Hogan, Coscina, & Himms-Hagen, 1982; Preston, Triandafillou, & Haas, 1989). El VMH juega un papel muy importante en la regulación de la termogénesis y esto es debido a que es capaz de integrar diversas señales periféricas para coordinar una respuesta termogénica modulando el tono simpático hacia el WAT y el BAT, estando directamente conectado con los depósitos de grasa blanca y parda (Bamshad, Aoki, Adkison, Warren, & Bartness, 1998; Bamshad, Song, & Bartness, 1999) a través del rafe pálido (RPa, *raphe pallidus*) y la oliva inferior (IO, *inferior olive*) en el tronco cerebral (Cano et al., 2003; Lindberg, Chen, & Li, 2013; Lopez et al., 2010; Martínez de Morentin et al., 2014; S. F. Morrison, 1999; Uno & Shibata, 2001) (Imagen 6).

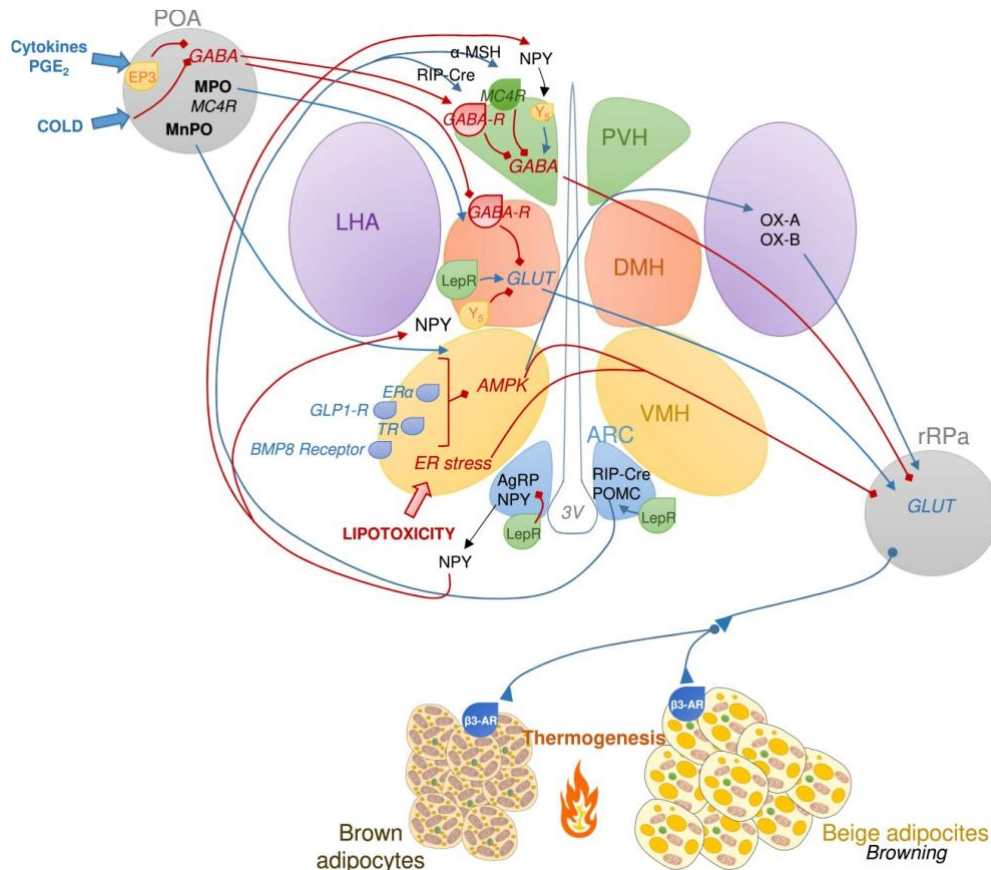


Imagen 6. Circuitos hipotalámicos que regulan la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT (Contreras, Nogueiras, Dieguez, Rahmouni, & Lopez, 2017). Licencia Creative Commons.

A continuación, se explica más en profundidad la implicación de los núcleos hipotalámicos que tienen mayor importancia 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 de alimentos. Se localiza en la parte inferior del hipotálamo a ambos lados del tercer ventrículo, próximo a la eminencia media. La eminencia media es una región del cerebro donde la BHE permite el paso de señales circulantes procedentes de la periferia que reflejan el estado nutricional del organismo como como la leptina, la ghrelina o la insulina (Herwig, Ross, Nilaweera, Morgan, & Barrett, 2008; Simpson, Martin, & Bloom, 2009).

En el ARC se distinguen dos poblaciones primarias de neuronas que integran las señales del balance energético y que ejercen efectos opuestos. Una de estas poblaciones de neuronas expresa neuropéptidos orexigénicos como son NPY y AgRP, que estimulan la ingesta de alimentos. Se encuentran en la zona ventromedial del ARC y proyectan sus axones mayoritariamente a otras neuronas de segundo orden localizadas en otras áreas hipotalámicas como el núcleo paraventricular (PVH, *paraventricular nucleus of the hypothalamus*) y el VMH (Palkovits, 2003; Simpson et al., 2009).

AgRP actúa como un agonista inverso de los receptores de melanocortinas (Graham, Shutter, Sarmiento, Sarosi, & Stark, 1997; Ollmann et al., 1997; Small et al., 2003). 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 (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997). NPY se expresa en todo el SNC, pero la mayoría de las neuronas que expresan NPY se encuentran en el ARC (Gehlert, Chronwall, Schafer, & O'Donohue, 1987), donde actúa sobre sus receptores 1-5 (NPYR1-5, *neuropeptide Y receptors 1-5*). La expresión de NPY se incrementa durante el ayuno y disminuye durante la ingesta (Kane et al., 2011; Ziouzenkova & Plutzky, 2008). NPY también está implicado en el metabolismo energético, dado que la inyección de NPY intracerebroventricular (ICV) estimula la ingesta (Clark, Kalra, Crowley, & Kalra, 1984) e induce una disminución de la termogénesis en el BAT (Egawa, Yoshimatsu, & Bray, 1991; Shi et al., 2013), efecto que está asociado a la inhibición del eje tiroideo (Fekete et al., 2001; Fekete et al., 2002; Mercader et al., 2006). Estas neuronas tienen extensas proyecciones dentro del hipotálamo incluyendo el PVH, el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH, *dorsomedial nucleus of the hypothalamus*) y el LHA, que parecen ser la principal diana de los efectos orexigénicos de NPY (Simpson et al., 2009).

Otra gran población sobreexpresa los neuropéptidos anorexigénicos POMC y CART, que inhiben la ingesta de alimentos. Se encuentra en la zona ventrolateral del ARC y proyecta a zonas más amplias del SNC, a núcleos hipotalámicos secundarios, como el DMH, el LHA, el VMH 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 ingesta (Lopez et al., 2007).

La excitación de las neuronas POMC reduce la ingesta (Aponte, Atasoy, & Sternson, 2011), mientras que su ablación da lugar a hiperfagia y obesidad (Challis et al., 2004; A. S. Chen et al., 2000; Vaisse, Clement, Guy-Grand, & Froguel, 1998; Yaswen, Diehl, Brennan, & Hochgeschwender, 1999; Zhan et al., 2013). POMC actúa como péptido precursor de tal forma que tras su escisión produce la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH, *α -melanocyte stimulating hormone*) que ejerce sus efectos a través de la unión a receptores de melanocortinas, acoplados a proteínas G. Existen cinco tipos de MC-Rs aunque solo el MC3-R y el MC4-R (MC3R y MC4R, *melanocortin receptors 3 and 4*) se expresan en el cerebro, siendo este último el más expresado en el hipotálamo (Elias et al., 1999).

Los ratones deficientes para MC4R muestran hiperfagia y gasto energético disminuido por lo que desarrollan obesidad (Huszar et al., 1997; Simpson et al., 2009). La ingesta modula la expresión de POMC y de α -MSH, de modo que sus niveles aumentan durante la ingesta y se reducen durante el ayuno (Schwartz et al., 1997). 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 ICV de CART en ratas inhibe la ingesta, mientras que la inyección ICV de antisuero de CART produce hiperfagia (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998; Thim, Kristensen, Larsen, & Wulff, 1998). Sus niveles correlacionan con los niveles de leptina circulante (Kristensen et al., 1998; Schwartz et al., 2000), de forma que se incrementan al administrar leptina periférica (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998; C. Wang, Billington, Levine, & Kotz, 2000). Asimismo, se ha descrito

también la capacidad de CART para estimular la termogénesis en el BAT (Kotz, Wang, Briggs, Levine, & Billington, 2000).

3.2 NÚCLEO VENTROMEDIAL

El VMH lo conforman un grupo de células bilaterales situadas en la base del hipotálamo, adyacentes al tercer ventrículo y lateralmente al ARC. El VMH fue el primer núcleo hipotalámico considerado regulador de la termogénesis, cuando se observó que su estimulación eléctrica inducía el aumento de la temperatura del BAT, efecto abolido por el bloqueo de los RA- β 3 (Holt, Wheal, & York, 1987; Hugie, Halvorson, & Thornhill, 1992; Kelly & Bielajew, 1991; Perkins, Rothwell, Stock, & Stone, 1981; Saito, Minokoshi, & Shimazu, 1987; Yoshida & Bray, 1984). El VMH es un núcleo muy importante en la modulación de la masa corporal y de la homeostasis de la glucosa (Amir, 1990; Dhillon et al., 2006; King, 2006; Minokoshi, Saito, & Shimazu, 1986; Rothwell & Stock, 1979). Además, el VMH se ha relacionado con un gran número de funciones homeostáticas y conductuales, entre las que se encuentran la regulación del comportamiento sexual femenino o la función cardiovascular (McClellan, Parker, & Tobet, 2006; Shimogawa, Maekawa, & Yamanouchi, 2014).

En el VMH existen distintos tipos celulares con patrones de expresión génica muy variados (Imagen 7) como pueden ser el receptor cannabinoide 1 (CB1, *cannabinoid receptor 1*), cerebelin 1 (Cbln1, *cerebellin 1*), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), el receptor de progesterona (PR, *progesterone receptor*), el receptor de estrógenos alfa (ER α , *estrogen receptor alpha*), el receptor de HT (Contreras, Nogueiras, et al., 2017) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP, *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) (Kim, 2008; Liao et al., 2012; Segal et al., 2005; Xu et al., 2003). Sin embargo, el factor esteroidogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*) es el único gen expresado en el VMH que es exclusivo de este núcleo dentro del SNC (Bingham, Anderson, Reuter, Stallings, & Parker, 2008; Dhillon et al., 2006). SF1 es un factor de transcripción necesario para el desarrollo y para la modulación de procesos fisiológicos en los que interviene el VMH (Kurrasch et al., 2007; Majdic et al., 2002; Segal et al., 2005). El receptor de leptina (LepR, *leptin receptor*) y el receptor de insulina (IR, *insulin receptor*) también se expresan abundantemente en el VMH (Elmqvist, Bjorbaek, Ahima, Flier, & Saper, 1998; Klockener et al., 2011). Las neuronas que son sensibles a leptina e insulina se corresponden con el tipo neuronal que expresa SF1 (Choi, Fujikawa, Lee, Reuter, & Kim, 2013; Klockener et al., 2011; K. W. Williams et al., 2010).

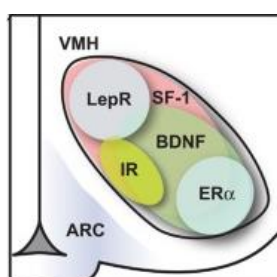


Imagen 7. Grupos neuronales del VMH. Licencia Creative Commons.

El VMH recibe numerosas proyecciones del ARC procedentes de neuronas NPY, AgRP y POMC (Palkovits, 2003; Simpson et al., 2009). En él se expresan los receptores de NPY Y1 e Y5 así como MC4R (Harrold, Widdowson, & Williams, 1999; Y. Z. Li & Davidowa, 2004; Lopez-Valpuesta, Nyce, Griffin-Biggs, Ice, & Myers, 1996) y también presenta receptores para dopamina, serotonina, GABA e histamina (Shimogawa et al., 2014). Las neuronas del VMH encargadas de la homeostasis de la glucosa responden a las señales de las poblaciones POMC/CART y AgRP/NPY del ARC mediando los efectos de la leptina, la insulina y la ghrelina (King, 2006). Para ello, estas neuronas sintetizan BDNF, que presenta un efecto directo en la anorexia mediada por leptina (Pandit, de Jong, Vanderschuren, & Adan, 2011; C. Wang, Bomberg, Billington, Levine, & Kotz, 2007), y también regula la masa corporal en roedores y humanos (Lyons et al., 1999; Rios et al., 2001; Xu et al., 2003).

Otras áreas del cerebro implicadas en la homeostasis energética tienen conexiones neuronales con el VMH. Desde este núcleo conecta con áreas hipotalámicas como el DMH y LHA, donde incrementa los niveles de orexinas que median la activación del SNS hacia el BAT y el WAT, y también con regiones extrahipotalámicas como pueden ser el tronco cerebral, donde se modula el SNS que tiene efectos sobre la termogénesis, la amígdala y la eminencia media (Seoane-Collazo et al., 2015; C. Wang et al., 2007).

Existen distintas señales periféricas que en el VMH activan la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT, entre ellas las HT (Alvarez-Crespo et al., 2016; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017), la proteína morfogenética ósea 8B (BMP8B, *bone morphogenetic protein 8B*) (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012), la leptina (Tanida, Yamamoto, Shibamoto, & Rahmouni, 2013), el estradiol (Gonzalez-Garcia et al., 2018; Gonzalez-Garcia, Tena-Sempere, & Lopez, 2017; Martinez de Morentin et al., 2014; Tanida et al., 2013), los análogos de GLP-1 (Beiroa et al., 2014) y drogas como la nicotina (Martinez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014). Todas ellas actúan a través de un mecanismo que, mediante la inhibición de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), activa el SNS hacia el BAT y el WAT (Beiroa et al., 2014; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Martins et al., 2016). Por todo ello, el sensor energético AMPK en el VMH ha sido propuesto como un regulador canónico del tejido adiposo en el SNC a través del SNS (Labbe et al., 2015).

Datos recientes han propuesto que la inhibición de AMPK en el VMH producida por BMP8B, estimula el sistema de orexinas en el núcleo lateral hipotalámico (LHA, *lateral hypothalamic area*) a través de fibras glutamatérgicas, y que esto activa el SNS induciendo la termogénesis en el BAT y el WAT (Martins et al., 2016). El LHA además de regular la termogénesis en el BAT, ha demostrado ser un modulador del *browning* en el WAT a través de las orexinas, unos neuropéptidos orexigénicos que se expresan en este área (Hara et al., 2001; Lubkin & Stricker-Krongrad, 1998; Martins et al., 2016; Sellayah & Sikder, 2012; Teske, Levine, Kuskowski, Levine, & Kotz, 2006; J. Wang, Osaka, & Inoue, 2001; Yoshimichi, Yoshimatsu, Masaki, & Sakata, 2001) y que también son necesarias para una correcta diferenciación de los adipocitos marrones (Sellayah, Bharaj, & Sikder, 2011).

Otras evidencias demuestran que los lípidos complejos como las ceramidas, están relacionadas con la modulación de la termogénesis. Así, estados de obesidad se han relacionado con niveles elevados de ceramidas en el hipotálamo, produciendo lipotoxicidad y disminución del tono simpático hacia el BAT, reduciendo la termogénesis, lo que se relaciona

con altos niveles de estrés del retículo endoplásmico (RE) (Contreras et al., 2014). La sobreexpresión de la chaperona conocida como proteína relacionada con glucosa 78 (GRP78, *glucose related protein 78*) específicamente en el VMH, promueve y acelera el correcto plegamiento de las proteínas en el RE, aliviando así su estrés, favoreciendo también los procesos termogénicos en el BAT y el *browning* del WAT en roedores con fenotipo obeso (Contreras et al., 2014; Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Linares-Pose et al., 2018). Todas estas evidencias ponen de manifiesto la gran implicación que tiene el VMH en la regulación de la termogénesis en el BAT y en el WAT.

3.3 NÚCLEO DORSOMEDIAL

El DMH se localiza a ambos lados del tercer ventrículo, inmediatamente dorsal al VMH. Está implicado en un amplio número de procesos fisiológicos como el apetito, el estrés, la termorregulación o los ritmos circadianos (Schneeberger et al., 2014).

Este núcleo posee capacidad de integración de señales de otras áreas hipotalámicas, ya que recibe proyecciones del ARC (Bai et al., 1985) de neuronas NPY/AgRP y POMC/CART (Schwartz et al., 2000), y envía a su vez, proyecciones al PVH y al VMH (Guan et al., 1998; Thompson, Canteras, & Swanson, 1996). Contiene receptores de leptina e insulina (Marks, Porte, Stahl, & Baskin, 1990; Mercer et al., 1996) y sólo unos pocos péptidos orexigénicos y anorexigénicos son expresados en este núcleo (Palkovits, 2003). La deficiencia del receptor de leptina en este núcleo provoca una disminución de la actividad del SNS y, por consiguiente, en la termogénesis del BAT, incrementando la masa corporal. (Contreras, Nogueiras, et al., 2017; Enriori, Sinnayah, Simonds, Garcia Rudaz, & Cowley, 2011; Rezai-Zadeh et al., 2014). Algunos de estos neuropéptidos son NPY y CART, vinculados a la respuesta hiperfágica típica de la gestación (Garcia et al., 2003) y en respuesta al ayuno (Henry et al., 2001). En este núcleo se localizan también una población de neuronas que expresan el péptido similar a la galanina (GALP, *galanin-like peptide*) (Jureus, Cunningham, McClain, Clifton, & Steiner, 2000; Palkovits, 2003). Además, desde el DMH se proyectan fibras α -MSH al PVH, que alcanzan a neuronas de hormona liberadora de tirotropina (TRH, *thyrotropin-releasing hormone*) (Mihaly, Fekete, Legradi, & Lechan, 2001).

Estudios de lesión en este núcleo mostraron una posible relación con el control de la ingesta, ya que se ve inhibida cuando se lesiona el DMH (Bernardis & Bellinger, 1987). También se observó cómo señales anorexigénicas, procedentes de la leptina, u orexigénicas, procedentes de NPY, actúan en este núcleo inhibiendo o estimulando la ingesta, respectivamente (Bi, Kim, & Zheng, 2012; Elmquist, Ahima, Elias, Flier, & Saper, 1998; Yang et al., 2009).

Además, NPY en el DMH modula el gasto de energía, ya que afecta a la formación de adipocitos marrones y a la termogénesis (Bi et al., 2012). La ausencia de NPY en el DMH aumenta la termogénesis en animales (Chao, Yang, Aja, Moran, & Bi, 2011) debido a la producción de *browning* en el WAT, a un incremento en la actividad de los adipocitos marrones y a un mayor desarrollo de estos (Chao et al., 2011).

3.4 NÚCLEO PARAVENTRICULAR

El PVH está localizado en el hipotálamo anterior, a ambos lados del techo del tercer ventrículo. Se caracteriza por ser un centro integrador, en el cual convergen numerosas vías neurales que modulan la homeostasis energética. Recibe numerosas aferencias desde otras regiones hipotalámicas, del hipocampo, del tronco cerebral, así como señales de sensores del estado fisiológico del organismo (Sutton, Myers, & Olson, 2016).

Las neuronas sensibles a leptina localizadas en el ARC proyectan sus axones a este núcleo (Cowley et al., 1999; Sutton et al., 2014). Presenta una amplia inervación desde las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del ARC y también de neuronas orexina (OX, *orexin*) del LHA (Cowley et al., 1999; Elmquist, Bjorbaek, et al., 1998; Elmquist, Elias, & Saper, 1999; C. Li, Chen, & Smith, 2000). La ruta de las melanocortinas está estrechamente ligada a la función del PVH y en él podemos ver también una densa expresión de receptores de melanocortinas (Kishi et al., 2003; Sutton et al., 2014).

El PVH es un núcleo en el que abundan las neuronas que sintetizan neuropéptidos vinculados a la regulación de la ingesta como NPY, galanina, α -MSH, NE, serotonina y péptidos opioides. El PVH es un núcleo especialmente sensible a los efectos de estos neurotransmisores sobre el gasto energético y la ingesta (Cone, 2005). Por otro lado, la administración de un agonista del receptor de melanocortinas aumenta el gasto energético (Cowley et al., 1999; Sutton et al., 2014) ya que en este núcleo se expresan los receptores MC4R que estimulan la termogénesis e inhiben la ingesta (Skibicka & Grill, 2009; Song et al., 2008).

El PVH de rata presenta dos grandes regiones neuronales, la parvocelular y la magnocelular. Las neuronas de la zona magnocelular liberan vasopresina y oxitocina al torrente sanguíneo. La oxitocina está también implicada en la regulación de la ingesta, ya que las neuronas AgRP del ARC pueden potenciar la ingesta de alimentos inhibiendo las neuronas que expresan oxitocina en el PVH (Atasoy, Betley, Su, & Sternson, 2012). Las neuronas de la región parvocelular proyectan sus axones al núcleo motor dorsal de vago, al NTS y a la columna celular intermediolateral de la médula espinal (Seoane-Collazo et al., 2015). De esta manera regulan la termogénesis, la secreción pancreática, el flujo de glucosa hepática y la captación de glucosa periférica (Geerling, Shin, Chimenti, & Loewy, 2010; Hill, 2012; S. Stanley et al., 2010). Las neuronas de la región parvocelular también liberan péptidos señalizadores en la eminencia media (ME, *median eminence*) regulando así la síntesis de hormonas hipofisarias. Estas hormonas son la TRH, que regula el eje tiroideo y la hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotrophin-releasing hormone*), que regula el eje adrenal. Las neuronas CRH y TRH tienen un papel en la regulación de la ingesta y del balance energético, teniendo ambas un efecto inhibitorio sobre la ingesta de alimentos. Estos grupos neuronales son, a su vez, estimuladas por las neuronas POMC/CART e inhibidas por las neuronas NPY/AgRP del ARC (Arase, York, Shimizu, Shargill, & Bray, 1988; Pandit et al., 2011; Schwartz et al., 2000). La CRH, TRH y oxitocina son sumamente importantes en la regulación de la ingesta y el gasto energético, ya que responden a déficit de energía alterando el eje neuroendocrino y modulando el tono simpático o parasimpático, modulando así la función de los distintos órganos periféricos (Jansen, Hoffman, & Loewy, 1997; Song et al., 2008; S. Stanley et al., 2010). De este modo, se ha descrito que lesiones en el PVH dan lugar a un incremento de la ingesta, con el consecuente desarrollo de obesidad (Aravich & Sclafani, 1983; Tokunaga, Fukushima, Kemnitz, & Bray, 1986).

3.5 ÁREA LATERAL HIPOTALÁMICA

Estudios realizados en animales han descrito los mecanismos de regulación de la ingesta por este núcleo. Así, la estimulación eléctrica del LHA incrementa la ingesta, mientras que su lesión la disminuye, llegando a anularla por completo (Anand & Brobeck, 1951; Palkovits, 2003), ocasionando la consiguiente pérdida de masa corporal. Las lesiones en el LHA también producen graves alteraciones metabólicas y endocrinas, como los problemas de crecimiento, la disfunción del eje tiroideo y de la homeostasis de la glucosa (Bernardis & Bellinger, 1996; Lopez et al., 2010).

El LHA es una región del hipotálamo que comprende una población de neuronas grande y difusa en la que se incluyen subpoblaciones definidas que expresan neuropéptidos orexigénicos; la hormona concentradora de melanina (MCH, *melanin-concentrating hormone*) y las OX (Broberger, De Lecea, Sutcliffe, & Hokfelt, 1998; Sakurai et al., 1998; van den Top, Lee, Whyment, Blanks, & Spanswick, 2004).

Desde el LHA se proyectan axones a otras áreas del cerebro, como el ARC y otros núcleos hipotalámicos y al sistema mesolímbico, que es el encargado del control hedónico del comportamiento de la ingesta (Pandit et al., 2011; Saper, Chou, & Elmquist, 2002). Además, al LHA llegan numerosas señales que integra para regular la actividad, la ingesta y el estado de alerta, según las condiciones nutricionales y ambientales (Goforth, Leininger, Patterson, Satin, & Myers, 2014; S. D. Morrison, Barnett, & Mayer, 1958). Este núcleo presenta terminales de neuronas AgRP, NPY y α -MSH que hacen sinapsis con neuronas que expresan MCH y OX en el LHA (Broberger et al., 1998; Goforth et al., 2014; Horvath, Diano, & van den Pol, 1999). Existe una región dentro del LHA que contiene una gran densidad de receptores de NPY-Y5 que son responsables de los efectos estimulantes de NPY sobre la ingesta de alimentos (Y. Hu et al., 1996). El LHA también contiene un elevado número de neuronas sensibles a la glucosa que responden a sus niveles plasmáticos a través de vías aferentes del hipotálamo (Bernardis & Bellinger, 1996).

Neuronas OX

Las OX son neuropéptidos expresado por neuronas localizadas en el LHA con dos isoformas que derivan de un mismo precursor: OX-A y OX-B. Estas actúan a través de los receptores de OX 1 y 2 (OX1R y OX2R, *orexin receptor 1 and 2*). Su expresión en forma de prohormona se estimula en estados de ayuno y su administración central incrementa la ingesta actuando a través de sus receptores OX1R y OX2R (Alvarez-Crespo et al., 2013). Se ha descrito que la leptina inhibe la activación de estas neuronas, siendo considerado un modulador importante de la expresión de OX (Goforth et al., 2014; Lopez et al., 2000; Yamanaka, Tabuchi, Tsunematsu, Fukazawa, & Tominaga, 2010), ya que de hecho, la administración central de OX-A favorece la ingesta de alimentos (Lopez et al., 2010; Sakurai et al., 1998). Otra acción de la OX es la regulación de los ciclos de sueño, de forma que su ausencia puede provocar narcolepsia. Esto se ha postulado como explicación a los efectos que este neuropéptido tiene sobre la ingesta, que pueden derivar de la excitación y el sueño reducido (Hagan et al., 1999; Hara et al., 2001; Simpson et al., 2009). Las neuronas OX también juegan un papel en la modulación de la tasa metabólica, la actividad física y la termogénesis (Nixon, Kotz, Novak, Billington, & Teske, 2012). En cuanto a la regulación de la termogénesis, las neuronas OX proyectan desde el LHA al RPa en el troncoencéfalo,

estimulando la termogénesis en ratas (Tupone, Madden, Cano, & Morrison, 2011). Las neuronas OX también presentan proyecciones hacia distintos núcleos hipotalámicos como el ARC, VMH y PVH; pero también a regiones extrahipotalámicas como el núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus of the solitary tract*) y a otras áreas cerebrales que regulan la temperatura y el estado de consciencia (Peyron et al., 1998).

Neuronas MCH

La MCH es un neuropéptido orexigénico, que se encuentra localizado principalmente en el LHA, pero presenta proyecciones hacia diferentes áreas del cerebro (Bittencourt et al., 1992). En humanos se han identificado dos receptores para MCH (Mchr1 y Mchr2), a diferencia de los roedores, en los que sólo se ha identificado Mchr1 (Chen et al. 2002). Los niveles de MCH, al igual que las OX, se ven incrementados en estados de ayuno (Qu et al., 1996). Los ratones con deficiencia de este receptor muestran un aumento del gasto energético, de la actividad locomotora y son resistentes a la obesidad inducida por dieta (Y. Chen et al., 2002; Simpson et al., 2009). Por el contrario, la sobreexpresión en ratones de MCH induce obesidad y resistencia a la insulina (Y. Chen et al., 2002). De manera similar, la administración de MCH específicamente en el LHA aumenta la ingesta en ratas y un produce un incremento de la lipogénesis hepática mediada por el sistema nervioso parasimpático (SNPS) y el SNS (Y. Chen et al., 2002; Imbernon et al., 2013; Qu et al., 1996).

4 LA NICOTINA Y EL BALANCE ENERGÉTICO

4.1 NICOTINA

La nicotina es un estimulante y un potente alcaloide parasimpatomimético que se produce de forma natural en la familia de las plantas solanáceas. Esta actúa como agonista de los receptores acetilcolinérgicos nicotínicos (nAChRs, *nicotinic acetylcholine receptors*) (Gotti C, 2019; Kishioka, Kiguchi, Kobayashi, & Saika, 2014; Malenka, 2009). Es un compuesto natural presente en el tabaco, encontrándose en las hojas de las plantas de *Nicotiana tabacum* en un rango del 0,5 al 7,5% dependiendo de la variedad de la misma. También existe presencia de nicotina en las hojas de *Nicotiana rustica* en cantidades que van desde el 2 al 14%. Aparte de en la planta de tabaco, la nicotina también se encuentra en menores cantidades en los vegetales comestibles de la familia Solanaceae, como las patatas, los tomates, los pimientos o las berenjenas (Siegmond, Leitner, & Pfannhauser, 1999).

La nicotina es una sustancia muy adictiva (Grana, Benowitz, & Glantz, 2014; Holbrook, 2016; Siqueira, Committee On Substance, & Prevention, 2017), lo cual hace muy difícil abandonar su uso (Siqueira et al., 2017). Esta circunstancia hace que el tabaco sea una de las drogas de abuso más comúnmente consumidas (Sajja, Rahman, & Cucullo, 2016). De media, un cigarrillo contiene una cantidad de entre 10 y 14 mg de nicotina (Benowitz & Jacob, 1984; Kozlowski et al., 1998), de los cuales unos 2 mg son absorbidos por el organismo. Cantidades más altas podrían ser perjudiciales (Mayer, 2014). Esta sustancia se consume de forma compulsiva y la dependencia de ella se puede desarrollar en días (Stolerman & Jarvis, 1995). La dependencia a la nicotina causa angustia y genera tolerancia sensibilización, así como dependencia física y psicológica (Caponnetto, Campagna, Papale, Russo, & Polosa, 2012; Jain, Mukherjee, & Balhara, 2008; Miyasato, 2013; Parrott, 2006,

2015). Los síntomas derivados de la abstinencia a la nicotina producen un estado de ánimo depresivo, estrés, irritabilidad, ansiedad y dificultad para concentrarse (D'Souza & Markou, 2011). Cuando se abandona el hábito tabáquico, estos síntomas empeoran de forma acusada para luego volver a un estado normal de forma gradual (Parrott, 2003). Otros productos para el consumo de nicotina consisten en mascar o esnifar tabaco, fumar puros, cigarrillos electrónicos, o tabaco en pipa (El Sayed & Sylvester, 2007; Rahman, Hann, Wilson, & Worrall-Carter, 2014).

Los jóvenes son especialmente sensibles a los efectos de la nicotina, ya que puede dañar el cerebro en desarrollo (Schraufnagel, 2015). La nicotina también es potencialmente dañina en no fumadores y se ha visto que produce alteraciones en el desarrollo neuronal de diversos sistemas de neurotransmisores fetales durante el embarazo, por ello se considera teratógeno en humanos (Kohlmeier, 2015). A pesar de esto, el empleo de la nicotina como una herramienta para abandonar el hábito de fumar a través de productos de productos como chicles o parches transdérmicos, presenta un perfil muy seguro (Schraufnagel et al., 2014).

4.2 FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINÁMICA DE LA NICOTINA

La nicotina actúa como un agonista sobre la mayoría de los nAChRs, excepto en dos subunidades del receptor nicotínico (nAChR α 9 y nAChR α 10) dónde funciona como un antagonista (Gotti C, 2019; Malenka, 2009).

Cuando la nicotina penetra en el organismo, ésta se distribuye rápidamente a través de la circulación sanguínea y atraviesa la BHE, llegando a alcanzar el cerebro en unos 20 segundos después de una inhalación de un cigarrillo (Le Houezec, 2003). La vida media de este compuesto es de unas 2 horas y se excreta principalmente por la orina (Benowitz, Jacob, Jones, & Rosenberg, 1982). La cotinina es un metabolito activo de la nicotina que puede permanecer en la sangre durante más tiempo, haciendo mucho más fácil su análisis (Benowitz, Hukkanen, & Jacob, 2009). La cantidad de nicotina que es absorbida por el organismo al fumar puede depender de muchos factores, como los distintos tipos de tabaco, si el humo se ha inhalado o no, o si se ha usado un filtro.

La nicotina se metaboliza en el hígado por las enzimas del citocromo P450, mayoritariamente CYP2A6 y también CYP2B6, junto con la trimetilamina monooxigenasa (FMO3, *flavin-containing monooxygenase 3*) que metaboliza de forma selectiva la (S)-nicotina. La CYP2A6 es una isoforma más eficiente y es prácticamente específica del hígado (Swan et al., 2005).

A parte de la cotinina, el metabolito principal, existen otros metabolitos primarios como el N-óxido de nicotina, la nornicotina, el ión isometonio de nicotina, la 2-hidroxinicotina y el glucurónido de nicotina (Hukkanen, Jacob, & Benowitz, 2005). De forma aproximada, prácticamente la totalidad de una dosis sistémica de nicotina se puede calcular por la presencia de ésta y de sus metabolitos excretados en orina (Benowitz, Jacob, Fong, & Gupta, 1994). Se ha determinado en estudios con nicotina y cotinina marcadas que cerca del 80% de la nicotina absorbida se metaboliza en cotinina en sus distintas formas (Benowitz & Jacob, 1994). El N'-óxido de nicotina representa un 4-7% de la dosis total, y el glucurónido de nicotina entre un 3 y un 5% (Byrd, Chang, Greene, & deBethizy, 1992).

El proceso de absorción de la nicotina a través de las membranas biológicas es dependiente del pH (Benowitz et al., 2009). La nicotina es una base débil, por lo tanto, en ambientes como la saliva, que es ligeramente ácida, se va a encontrar ionizada y no va a poder atravesar las membranas (Gori, Benowitz, & Lynch, 1986). Por el contrario, cuando esta sustancia se encuentra en los alvéolos pulmonares, un medio neutro un poco básico, no se ioniza y puede atravesar con facilidad la membrana e introducirse en la circulación sanguínea (Pankow, 2001). Debido a esto la inhalación de nicotina es el método más eficiente de absorción ya que permite una rápida incorporación al torrente circulatorio pudiendo acceder directamente al cerebro sin tener que atravesar la barrera intestinal o sufrir metabolismo hepático (Armitage et al., 1975; Benowitz, 2009; Benowitz et al., 2009; Henningfield & Keenan, 1993).

La nicotina disminuye la sensación de hambre y el consumo de alimentos, reduciendo así la masa corporal (T. Hu, Yang, & Li, 2018). Los efectos de la nicotina sobre la masa corporal se originan como resultado de la estimulación de los $\alpha 3\beta 4$ nAChR localizados en las neuronas POMC en el ARC y del sistema de melanocortinas sobre receptores de melanocortinas en las neuronas de segundo orden en el PVH, modulando así la inhibición de la ingesta (T. Hu et al., 2018; Picciotto & Mineur, 2014). Las neuronas POMC son un precursor del sistema de melanocortinas, un importante regulador del balance energético.

4.3 EFECTOS CENTRALES Y PERIFÉRICOS

La nicotina presenta un efecto psicoactivo al unirse a los nAChRs en el cerebro, aumentando los niveles de distintos neurotransmisores en diferentes estructuras cerebrales (Pomerleau & Pomerleau, 1984; Pomerleau & Rosecrans, 1989). Este compuesto tiene una afinidad más alta por los receptores nicotínicos que se encuentran en el cerebro que por aquellos situados en el músculo esquelético. Esta selectividad de la nicotina se cree que puede deberse a la diferencia en un aminoácido en particular en ese subtipo de receptores (Xiu, Puskar, Shanata, Lester, & Dougherty, 2009).

Algo inusual que hace a la nicotina distinta de otras drogas, recae en que al incrementar la dosis cambia su perfil de estimulante a sedante (Parrott, 1998), así, a dosis muy elevadas, la nicotina disminuye la actividad neuronal (Wadgave & Nagesh, 2016). Estudios realizados sobre la cotinina sugieren que algunos de los efectos psicoactivos de la nicotina están mediados por este metabolito predominante (Grizzell & Echeverria, 2015).

La nicotina activa a los receptores nicotínicos, principalmente $\alpha 4\beta 2$, en neuronas que inervan el área ventral tegmental y también de la vía mesolímbica donde originan una liberación de dopamina (Dickson et al., 2011; Malenka, 2009). Esta liberación de dopamina inducida por nicotina se da, al menos en parte, a través de la activación del sistema de recompensa colinérgico-dopaminérgico en el área ventral tegmental (Dickson et al., 2011; Picciotto & Mineur, 2014), ya que la nicotina también puede modular la tasa de despolarización de las neuronas de esta zona (Picciotto & Mineur, 2014).

Por otra parte, la nicotina también parece inducir la liberación de opioides endógenos que activan las vías opioides en el sistema de recompensa, puesto que la naltrexona, que es un antagonista de los receptores opioides, bloquea el efecto de la nicotina (Malenka, 2009). Estos datos sugieren, que los receptores opioides están mediando los efectos sobre el sistema de

recompensa que refuerzan el consumo de esta sustancia tan adictiva (Malenka, 2009). En este sentido, el consumo crónico de nicotina favorece que se incremente la adicción por otras drogas. La nicotina incrementa la acetilación de las histonas mediante su unión a las desacetilasas de histonas, inhibiéndolas. Esto favorece que ocurran modificaciones epigenéticas que promueven incluso la adicción a la cocaína (A. Levine et al., 2011; Volkow, 2011).

La nicotina también activa el SNS, actuando a través de los nervios esplácnicos hacia la médula adrenal, estimulando así la liberación de adrenalina que es un neurotransmisor estimulante. Al unirse al receptor nicotínico $\alpha 3\beta 4$ de la médula adrenal, la nicotina aumenta el flujo de adrenalina, ya que provoca una despolarización celular y la entrada de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje. El calcio origina la exocitosis de los gránulos cromafines y esto libera la adrenalina hacia la circulación sanguínea (Yoshida, Sakane, Umekawa, & Kondo, 1994). La liberación de adrenalina causa un aumento en la presión sanguínea, en la respiración, en la frecuencia cardíaca y también eleva los niveles de glucosa (Marieb, 2007).

5 RECEPTORES ACETILCOLINÉRGICOS NICOTÍNICOS

Los nAChRs son un tipo de receptores polipeptídicos que son activados por el neurotransmisor acetilcolina y también por otras drogas como la nicotina, del que recibe su nombre. Existe otro tipo de receptores acetilcolinérgicos, que se conocen como muscarínicos, activados también por acetilcolina y selectivamente por muscarina (Ishii & Kurachi, 2006; Itier & Bertrand, 2001). Los nAChRs son receptores ionotrópicos, pertenecientes a un grupo de canales iónicos cuya apertura, gracias a la unión de un ligando, permite el paso de iones a través de la membrana (Itier & Bertrand, 2001; Kabbani et al., 2013). (Imagen 8)

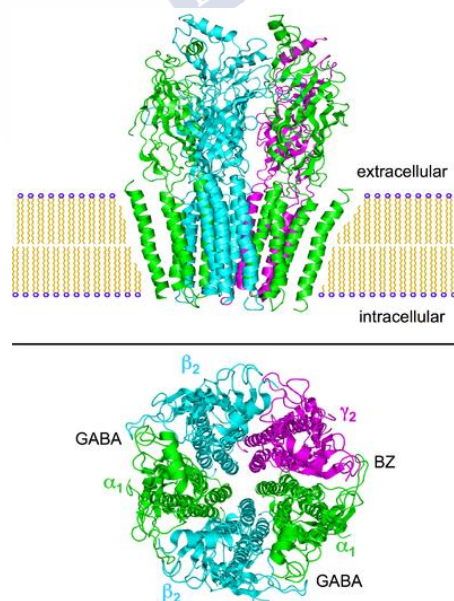


Imagen 8. Receptor acetilcolinérgico nicotínico. Licencia de Creative Commons.

Estos receptores se encuentran distribuidos por el SNC, el sistema nervioso periférico, el músculo esquelético y también otros tejidos. En la unión neuromuscular son los receptores primarios en la comunicación entre los nervios motores y el músculo para controlar el proceso de contracción muscular. En el sistema nervioso periférico estos transmiten señales de las células presinápticas a las postsinápticas tanto en el SNS como en el SNPS. En el sistema inmune, estos receptores regulan procesos inflamatorios a través de distintas vías intracelulares (Lu et al., 2014).

Los receptores nicotínicos presentan una estructura formada por cinco subunidades colocadas de forma simétrica formando un poro central (Purves, 2008). Cada subunidad posee cuatro dominios transmembrana y ambos extremos, N- y C- terminal, se localizan en el exterior de la célula. Estos receptores son similares a los receptores de ácido γ -aminobutírico (GABA_AR, *γ -aminobutyric acid receptor*) a los de serotonina y a los de glicina (Albuquerque et al., 1997; Cascio, 2004; Hogg, Raggenbass, & Bertrand, 2003; Jones, Sudweeks, & Yakel, 1999; McGehee & Role, 1995; Role & Berg, 1996).

5.1 ESTRUCTURA DEL RECEPTOR NICOTÍNICO

Los receptores nicotínicos se clasifican en dos grupos basándose en el lugar dónde se expresan. De este modo tenemos los receptores nicotínicos de tipo muscular y neuronal. En la unión neuromuscular, dónde se encuentran los receptores nicotínicos de tipo muscular, estos están formados por subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , ϵ y δ (Giniatullin, Nistri, & Yakel, 2005; Itier & Bertrand, 2001; Purves, 2008). En el subtipo neuronal los receptores pueden ser homoméricos, formados por un solo tipo de subunidad, o heteroméricos, con al menos una subunidad α y otra β . El resultado de los receptores heteroméricos puede ser la combinación de doce subunidades diferentes que van desde la $\alpha 2$ a la $\alpha 10$ y de la $\beta 2$ a la $\beta 4$. Algunos ejemplos de receptores nicotínicos de tipo neuronal podrían ser el $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$, $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ o $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$.

Para que se produzca la apertura del poro de un nAChR es necesario la unión de un ligando, que se produce en el dominio extracelular cerca del N terminal. Cuando un agonista se acopla al sitio de unión se produce un cambio conformacional y el canal iónico se abre (Colquhoun & Sivilotti, 2004). En los nAChRs de tipo muscular el sitio de unión del ligando se localiza entre las subunidades α y las ϵ o δ . En los de tipo neuronal, el lugar de unión se encuentra entre una subunidad α y una β , o entre dos subunidades α en el caso de los receptores $\alpha 7$ homoméricos. El nAChR es un canal catiónico no selectivo, lo que significa que distintos iones cargados positivamente pueden atravesarlo (Purves, 2008). Es permeable al Na⁺ y al K⁺ pero con algunas combinaciones de determinadas subunidades puede ser también permeable al Ca²⁺ (Weber et al., 2005). Así como el compuesto endógeno acetilcolina se une a estos receptores, otros agonistas externos, a parte de la nicotina, son capaces de activarlo (epibatidina y colina). Existen antagonistas que cierran el receptor como la mecamilamina, la dihidro- β eritroidina o el hexametonio. Algunos nAChRs de tipo neuronal pueden afectar a la liberación de otros neurotransmisores (Itier & Bertrand, 2001).

Las subunidades que conforman a los receptores nicotínicos pertenecen a una familia multigénica, y la combinación de estas subunidades entre sí tiene como resultado un gran número de receptores diferentes. Estos receptores son muy variables en sus propiedades electrofisiológicas, cinéticas y farmacológicas. Pueden responder a la nicotina de forma

diferente a concentraciones efectivas variables. En los vertebrados han sido identificadas 17 subunidades de receptores nicotínicos. Estas subunidades se dividen en cuatro subfamilias basadas en similitudes en su secuencia proteica (Le Novère & Changeux, 1995). A pesar de la ingente cantidad de distintas combinaciones de este tipo de receptores, algunos de ellos son más comunes que otros. Los más ampliamente expresados incluyen $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$ (tipo muscular), $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$ (tipo ganglionar), $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (tipo neuronal) y $(\alpha 7)_5$ (tipo neuronal) (Albuquerque et al., 1997).

5.2 EFECTOS DE LA NICOTINA

La activación de los nAChRs por la unión de la nicotina modifica el estado de las neuronas mediante dos mecanismos principales. Uno es el movimiento de cationes que producen una despolarización de la membrana plasmática conduciendo a una activación de los canales iónicos dependientes de voltaje. Otro es la entrada de calcio que, directa o indirectamente, actúa sobre distintas cascadas intracelulares. Esto puede conducir tanto a la liberación de neurotransmisores como a la regulación de la actividad de algunos genes.

El papel de los nAChRs en el cerebro no está limitada a la señalización por neurotransmisión colinérgica. También puede participar en una regulación más global coactuando con otros neurotransmisores como el glutamato, la dopamina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), la serotonina o la NE dependiendo de su localización en la neurona (Alkondon, Pereira, Cortes, Maelicke, & Albuquerque, 1997; Gotti, Zoli, & Clementi, 2006; Jensen, Frolund, Liljefors, & Krogsgaard-Larsen, 2005; Lindstrom, 2003; McGehee, 1999; McGehee & Role, 1995, 1996; Schicker, Dorostkar, & Boehm, 2008). Además, los receptores nicotínicos parece que pueden estar involucrados en el mantenimiento de las sinapsis (Freeman, 1977) o la viabilidad de las neuronas (Hory-Lee & Frank, 1995; Renshaw, 1994; Treinin & Chalfie, 1995).

5.3 EXPERIMENTACIÓN CON NICOTINA

Existe una gran cantidad de trabajos de investigación centrados en el efecto de la nicotina en modelos animales, principalmente modelos de roedores. Se ha comprobado que, tanto en tratamientos agudos, como en crónicos, la nicotina induce una disminución de la masa del animal, mediante la regulación de distintos procesos que influyen sobre el balance energético. Uno de ellos es la reducción de la ingesta como consecuencia del aumento de los mecanismos saciantes (Bellinger, Wellman, Harris, Kelso, & Kramer, 2010; Blaha, Yang, Meguid, Chai, & Zadak, 1998; Bray, 2000; Grunberg, Bowen, & Winders, 1986). Sin embargo, la nicotina también produce el aumento del metabolismo energético, lo que también genera esa pérdida de masa corporal (Schechter & Cook, 1976; Sztalryd, Hamilton, Horwitz, Johnson, & Kraemer, 1996). Finalmente, se ha descrito que la nicotina aumenta los procesos de lipólisis (Andersson & Arner, 2001) y la actividad física de los roedores (Andersson & Arner, 2001; Gillman, Kosobud, & Timberlake, 2008, 2010), lo cual también contribuye significativamente a la reducción de la masa de los animales.

Experimentos de duración reducida o de larga exposición al humo del tabaco, han mostrado resultados similares a los mencionados anteriormente en roedores, sugiriendo que la nicotina es el compuesto responsable, presente en el humo del tabaco, de los efectos sobre la

homeostasis energética (H. Chen et al., 2007; Wager-Srdar, Levine, Morley, Hoidal, & Niewoehner, 1984).

En el caso de los humanos se ha observado que el humo del tabaco puede disminuir la ingesta, incrementar el metabolismo y aumentar la actividad locomotora al igual que se ha visto en modelos animales (Filozof, Fernandez Pinilla, & Fernandez-Cruz, 2004). La distribución por todo el organismo de los nAChRs hace que exista una interacción central y periférica en los efectos que la nicotina tiene sobre la homeostasis energética.

5.4 ACCIONES PERIFÉRICAS DE LA NICOTINA

La amplia distribución por todo el organismo de los nAChRs hace que prácticamente todos los sistemas que modulan el balance energético sean susceptibles de ser regulados por la nicotina. Varios órganos relacionados con el gasto energético expresan este tipo de receptores, incluyendo el tejido adiposo pardo y el blanco.

La nicotina puede actuar también sobre los receptores del gusto y su señalización, algo que se ha visto que ocurre en fumadores (Megerdichian, Rees, Wayne, & Connolly, 2007). Al poseer un sabor amargo, la nicotina puede modificar la ingesta de alimentos al alterar receptores gustativos para el sabor amargo (Z. Zhang, Zhao, Margolskee, & Liman, 2007). La delección de este receptor en ratones disminuye la respuesta a la nicotina en neuronas sensoriales primarias, lo que sugiere que la nicotina posee un mecanismo de transducción común al del sabor amargo (Oliveira-Maia et al., 2009).

Algunas evidencias demuestran que la administración aguda o crónica de nicotina sobre el sistema digestivo puede inducir modificaciones en los niveles plasmáticos y en los niveles de expresión de ARNm de algunos péptidos entéricos que regulan la ingesta (Chowdhury, Hosotani, Chang, & Rayford, 1990; Chowdhury, Hosotani, & Rayford, 1989; Gomez et al., 1996; Oliveira-Maia et al., 2009; Wong & Ogle, 1995). De forma similar, la exposición puntual o prolongada a la nicotina en cultivos de células del páncreas disminuye la secreción de insulina, efecto que puede estar mediado por una gran variedad de nAChRs (Yoshikawa, Hellstrom-Lindahl, & Grill, 2005).

Por otra parte, en el tejido adiposo blanco también están presentes los nAChRs (Andersson & Arner, 1995, 2001). De este modo, se ha visto que en fumadores las concentraciones plasmáticas de leptina se encuentran disminuidas (Reseland et al., 2005). La presencia de nAChRs en el tejido adiposo sugiere la existencia de un mecanismo molecular implicado en el hecho de que los fumadores presenten menor masa corporal, sin embargo son más susceptibles de padecer diabetes tipo 2 que los individuos no fumadores (Willi, Bodenmann, Ghali, Faris, & Cornuz, 2007).

La disminución de la masa corporal en humanos tras un tratamiento con nicotina es debida a la reducción del tejido adiposo, y esto se asocia a un efecto lipolítico. Diversos estudios observaron que el tratamiento con nicotina aumenta la lipólisis en el WAT, *in vivo* (Andersson & Arner, 2001; Mjos, 1988), *ex vivo* (Sztalryd et al., 1996) y en fumadores (Laudon Meyer, Waldenlind, & Marcus, 2005). A su vez, la nicotina induce el incremento de la lipoproteína lipasa (LPL, *lipoprotein lipase*) en distintos tejidos, así como el consiguiente aumento de los niveles circulantes de ácidos grasos libres y otros lípidos (Ashakumary &

Vijayammal, 1997). Además, la nicotina promueve la utilización de ácidos grasos libres como sustrato por el músculo esquelético, disminuyendo así el almacenamiento de grasa (Sztalryd et al., 1996). Se ha descrito que las acciones lipolíticas de la nicotina podrían ser debidas a su acción sobre el SNS, o de forma directa sobre el tejido adiposo blanco. De este modo, la administración de nicotina sobre el WAT, también promueve la lipólisis (Sztalryd et al., 1996) y sobre adipocitos en cultivo inhibe a la sintasa de ácidos grasos (FAS, *fatty acid sintase*) (An et al., 2007) y aumenta la actividad de la LPL (Chajek-Shaul et al., 1994; Liu, Mizuta, & Matsukura, 2004).

En cuanto al efecto de la nicotina sobre el BAT, no existen evidencias de la presencia de nAChRs en este tejido. A pesar de ello, se ha observado que tanto tratamientos agudos (Mano-Otagiri et al., 2010; Yoshida et al., 1994) como crónicos (Arai et al., 2001; Lupien & Bray, 1988; Yoshida et al., 1999) con nicotina, y también la exposición al humo del tabaco (H. Chen et al., 2008), activan al SNS, lo que indirectamente provoca que se libere NE y que aumente la expresión de UCP1 en el BAT, con su consiguiente incremento en la termogénesis (Arai et al., 2001; H. Chen et al., 2008; Mano-Otagiri, Iwasaki-Sekino, Ohata, Arai, & Shibasaki, 2009). Estos datos sugieren que las acciones de la nicotina sobre el BAT son mediados por el SNC a través de la activación del SNS (Usui et al., 2009).

5.5 ACCIONES CENTRALES E LA NICOTINA

Dentro del SNC, los nAChRs predominantes son los formados por subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2^*$. Dentro del hipotálamo se ha descubierto que los receptores $\alpha 7$ se localizan en los núcleos ARC, VMH y DMH (Seguela, Wadiche, Dineley-Miller, Dani, & Patrick, 1993) y que la expresión de $\alpha 4$ y $\beta 2$ recae en los núcleos PVH, LHA, VMH y DMH (Wada et al., 1989). Además de en el hipotálamo, también se ha observado la presencia de subtipos de estos receptores en el sistema mesolímbico, cuya función es la regulación del sistema hedónico (De Biasi & Dani, 2011; Grady et al., 2007).

5.5.1 Modulación de la homeostasis energética

Las neuronas de primer orden NPY/AgRP y POMC/CART en el ARC son cruciales en la regulación de la homeostasis energética. Debido a ello la relación entre estos grupos neuronales y la nicotina ha sido muy estudiada.

La nicotina, por tanto, tiene un potente efecto anorexigénico. En roedores se ha visto que la exposición al humo de tabaco induce una supresión de la expresión de NPY y AgRP produciendo la inhibición de la ingesta de alimentos (H. Chen et al., 2008; H. Chen et al., 2006; De Biasi & Dani, 2011; Grady et al., 2007). Con la administración directa de nicotina se obtienen resultados similares a los generados con humo de tabaco (Jo, Talmage, & Role, 2002), y estos efectos se revierten cuando se interrumpe el tratamiento crónico con nicotina (Nakhate, Dandekar, Kokare, & Subhedar, 2009). En cuanto a los niveles de POMC y CART en el ARC, se observa que su expresión aumenta después del tratamiento con nicotina (Kramer et al., 2007; Marty, Erwin, Cornell, & Zgombick, 1985). Esta regulación en los clústeres de neuronas del ARC se cree que está mediada por los $\beta 4^*$ -nAChRs (Mineur et al., 2011). También se ha propuesto que los efectos anorexigénicos son debidos a la acción directa de la nicotina sobre las neuronas POMC y que las alteraciones en NPY y AgRP son secundarias a esta disminución en la ingesta (Huang & Winzer-Serhan, 2007).

En otros estudios en los que se ha inyectado nicotina de forma específica en el VMH se ha observado que su acción a través de este núcleo sucede debido a un incremento en la liberación de dopamina y serotonina (Ramos et al., 2004). Tanto en el ARC como en el PVH se ha mostrado que las neuronas que expresan CART procesan el efecto anorexigénico de la nicotina en tratamientos agudos pero no en los crónicos (Dandekar, Nakhate, Kokare, & Subhedar, 2011).

El LHA parece estar relacionado también con las acciones de la nicotina sobre el balance energético (Seguela et al., 1993; Wada et al., 1989). El tratamiento con altas dosis de nicotina aumenta la expresión de c-Fos en el LHA, demostrando un incremento de la actividad neuronal, lo cual se relaciona con cambios en la expresión de las orexinas, y liberación de dopamina y serotonina para producir un efecto anorexigénico (Ramos et al., 2004), sin alterar a las neuronas MCH (Huang & Winzer-Serhan, 2007; Pasumarthi & Fadel, 2010; Pasumarthi, Reznikov, & Fadel, 2006).

En el LHA se ha observado que la nicotina induce el aumento en la transmisión gabaérgica produciendo una disminución de la ingesta (B. G. Stanley, Urstadt, Charles, & Kee, 2011) a través de los $\alpha 7$ -nAChRs (Jo & Role, 2002; Jo, Wiedl, & Role, 2005). A pesar de que el mecanismo exacto todavía se desconoce, la activación en la transmisión de GABA en el LHA promoviendo efectos anorexigénicos parece jugar un papel importante en la disminución de la ingesta inducida por nicotina.

5.5.2 Modulación del sistema hedónico

Se sabe que la nicotina afecta de forma importante a los sistemas de recompensa (De Biasi & Dani, 2011), sin embargo, todavía se desconocen los receptores, las neuronas y los circuitos involucrados en la acción de la nicotina sobre el componente hedónico de la ingesta. En este sentido, el candidato implicado con más probabilidades es el sistema mesolímbico dopaminérgico. Se sabe que la palatabilidad de los alimentos y otras señales asociadas, activan al sistema mesolímbico dopaminérgico. A su vez, la nicotina es un activador de las neuronas dopaminérgicas (De Biasi & Dani, 2011).

Recientemente se ha descubierto la composición de los nAChRs que participan en esta señalización. Los subtipos principales son dos, los $\alpha 4\beta 2^*$ y los $\alpha 6\beta 2^*$, que aparecen diseminados por toda esta estructura neuronal (De Biasi & Dani, 2011; Grady et al., 2007). Los receptores $\alpha 7$ se localizan de forma mayoritaria en los somas neuronales (Klink, de Kerchove d'Exaerde, Zoli, & Changeux, 2001).

Ratones tratados de manera aguda con nicotina, muestran un mayor interés por la recompensa más sabrosa (Brunzell et al., 2006), sin embargo, cuando se disminuye la palatabilidad de la recompensa, la nicotina no presenta un efecto tan acusado. Aún siendo escasos, en los tratamientos crónicos se repite el mismo patrón (Donny, Caggiula, Weaver, Levin, & Sved, 2011). La nicotina ejerce su acción a nivel central sobre el sistema de recompensa incrementando el refuerzo y el componente hedónico que producen los alimentos. Por otra parte, no podemos olvidarnos del efecto anorexigénico de la nicotina, algo que sugiere que esta sustancia realiza acciones opuestas en cada uno de estos sistemas. Los roedores alimentados con dieta alta en grasa presentan una disminución de la masa corporal y la ingesta mayor que los alimentados con dieta normal cuando reciben tratamiento con

nicotina (Mangubat et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014; Wellman et al., 2005). Esto sugiere una mayor importancia de los efectos sobre la homeostasis energética que sobre el sistema hedónico. Por otra parte, para poner de manifiesto esta dualidad, se ha visto que las ratas tratadas con nicotina pierden masa de manera menos importante cuando son alimentadas con comida más sabrosa, indicando una mayor contribución del sistema hedónico frente a la regulación del balance energético por parte de la nicotina (Grunberg, Bowen, Maycock, & Nespore, 1985). Dada la contradicción entre los efectos anorexigénicos y los efectos hedónicos de la nicotina, se requieren nuevos estudios para clarificar los mecanismos moleculares que los regulan.

5.5.3 Plasticidad neuronal

Recientemente se ha sugerido que los efectos de la nicotina sobre el sistema hedónico y homeostático pueden estar relacionados con efectos directos sobre la remodelación de circuitos neuronales. La activación de los nAChRs por la nicotina presenta un efecto potenciador de la excitación neuronal en el área ventral tegmental (VTA, *ventral tegmental area*) (Jin, Yang, Wang, & Wu, 2011). Estudios *in vitro* en secciones de VTA y en ratones genéticamente modificados, sugieren que la acción de la nicotina sobre la plasticidad neuronal se produce aumentando la señalización glutamatérgica a través de los $\alpha 7$ -nAChRs (Gao et al., 2010; Jin et al., 2011; Mansvelder, Keath, & McGehee, 2002; Mansvelder & McGehee, 2000; Pidoplichko et al., 2004). Además, tras la administración de nicotina en roedores jóvenes se ha observado un incremento en la densidad y la longitud de las espinas dendríticas (Brown & Kolb, 2001; McDonald et al., 2007), que por el contrario no ocurre en roedores adultos (McDonald et al., 2007). Estudios realizados en humanos muestran un aumento en las funciones cognitivas tras la administración de nicotina, y que esto se debe tanto a una modulación de la plasticidad de las neuronas como a un incremento en su excitabilidad (Grundey et al., 2012a, 2012b).

6 RECEPTOR OPIOIDE

6.1 TIPOS DE RECEPTORES

Los receptores opioides son un grupo de receptores celulares acoplados a proteínas G cuyos ligandos son los opioides, ya sea de procedencia endógena o exógena (Janecka, Fichna, & Janecki, 2004; Waldhoer, Bartlett, & Whistler, 2004). Algunos opioides endógenos son las encefalinas, las dinorfinas, las endorfinas, las endomorfina y la nociceptina. Estos ligandos se unen al receptor opioide de forma específica y reversible para producir sus acciones. Los receptores opioides se distribuyen ampliamente por el SNC (sobre todo en el VTA), en neuronas periféricas, en la médula espinal y en el tracto digestivo.

Se han identificado, al menos, tres tipos de receptores: receptor κ opioide (KOR, κ opioid receptor), receptor δ opioide (DOR, δ opioid receptor) y receptor μ opioide (MOR, μ opioid receptor) (Nogueiras et al., 2012). Todos ellos son muy similares en su estructura y son receptores que se encuentran en la membrana celular, de tipo metabotrópico. De forma

general, cuando un opioide se une a su respectivo receptor se produce una inhibición de la actividad neuronal, con lo que se disminuye su capacidad para liberar el neurotransmisor.

La β -endorfina se expresa en las células del ARC y en el tronco cerebral. Actúa vía MOR y tiene influencia sobre el apetito y sobre el comportamiento sexual. La dinorfina actúa sobre KOR y se localiza en la médula espinal y en otras regiones del cerebro, incluido el hipotálamo, en concreto el LHA, donde se co-expresa con OX (Bodnar, 2009). La encefalina se distribuye de forma amplia por todo el cerebro y actúa sobre DOR y MOR (Bodnar, 2009).

El sistema opioide, de entre todas sus acciones biológicas, se ha reconocido como un importante regulador en los procesos de recompensa neuronales que conducen a un comportamiento adictivo en el consumo de agonistas opioides u otras drogas como el alcohol o la nicotina. Muchas de estas estructuras involucradas en los comportamientos adictivos también están relacionadas con la recompensa que produce ingerir ciertos alimentos. Los receptores opioides se distribuyen a través del sistema nervioso central y pueden encontrarse en muchas regiones del cerebro relacionadas con la regulación de la homeostasis energética. Su papel en el control del balance energético ha sido muy estudiado (Bodnar, 2008; Yeomans & Gray, 2002).

Los antagonistas de los receptores opioides, como la naloxona, disminuyen la ingesta de alimentos sabrosos (Holtzman, 1979). Esto se ha observado también en modelos animales, en concreto roedores, incluyendo ratas con obesidad inducida por dieta o en las ratas Zucker genéticamente obesas (A. S. Levine, Grace, & Billington, 1991; Sahr et al., 2008; Shaw, 1993; Shaw, Mitch, Leander, Mendelsohn, & Zimmerman, 1991; Statnick et al., 2003). Por el contrario, los agonistas de los receptores opioides, como la morfina, elevan la ingesta (Gosnell, Levine, & Morley, 1986). Una administración aguda de morfina u otros agonistas opioides aumentan la ingesta y la masa corporal, mientras que un tratamiento crónico con morfina disminuye la ingesta y la masa del individuo. (Ferenczi et al., 2010). Teniendo en cuenta estos datos podemos ver que existe una relación muy intensa entre el sistema opioide, la variación de masa corporal y la ingesta de alimentos, sobre todo de aquellos con alta palatabilidad y que producen una mayor recompensa.

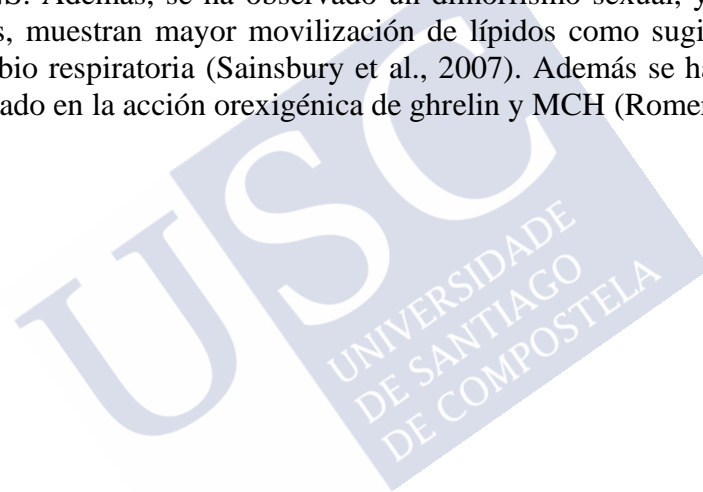
6.2 RECEPTOR κ OPIOIDE

El KOR es un receptor codificado por el gen *Opkr1*. Existen tres variantes del receptor: κ_1 , κ_2 y κ_3 (de Costa, Rothman, Bykov, Jacobson, & Rice, 1989; Rothman et al., 1989). Estos distintos subtipos se cree que provienen de la interacción de KOR con otras proteínas de membrana asociadas (Jordan & Devi, 1999). A él se une el péptido dinorfina como ligando endógeno principal (James, Chavkin, & Goldstein, 1982). Además de la dinorfina, se unen a este receptor una amplia variedad de alcaloides, terpenos y otros ligandos sintéticos. Los KOR se distribuyen ampliamente por el cerebro, la médula espinal y tejidos periféricos. Niveles altos de este receptor se han detectado en la corteza prefrontal, VTA, sustancia negra, núcleo accumbens, bulbo olfatorio, amígdala, hipocampo e hipotálamo, entre otros (Mansour, Fox, Akil, & Watson, 1995; Y. H. Wang, Sun, Tao, Chi, & Liu, 2010).

Recientemente ha sido demostrado que la ablación genética de KOR en ratones modifica el metabolismo de la glucosa, los lípidos y la energía en respuesta a una dieta alta en grasa. Así, los ratones carentes de KOR no ganan masa a pesar de una exposición prolongada

a dieta alta en grasa, derivado de unos niveles mayores de EE y LA (Czyzyk et al., 2010), así como reducción del almacén de grasas en el hígado debido a una menor formación de triglicéridos y aumento de la beta-oxidación de ácidos grasos hepáticos (Czyzyk et al., 2010).

Además de los efectos que genera la deficiencia de KOR, también se han estudiado las alteraciones que produce la carencia del ligando endógeno, dinorfina. De forma opuesta a la ablación de KOR en ratones, la eliminación de dinorfina no produce ningún cambio en la masa corporal de ratones alimentados con dieta alta en grasa (Sainsbury et al., 2007), sin embargo, sus niveles de NEFA en suero disminuyeron, indicando una disminución en la salida de ácidos grasos hacia la circulación o un aumento en la oxidación de ácidos grasos. Aunque no se han estudiado los tejidos en los que la oxidación de ácidos grasos pueda verse modificada, se puede pensar que la dinorfina y la vía de KOR tiene un papel importante en la regulación del metabolismo de ácidos grasos. Pero los aspectos más relevantes de los ratones carentes de dinorfina se observan durante el ayuno, ya que durante 24 horas de ayuno la falta de este péptido consigue reducir la masa grasa y la masa corporal (Sainsbury et al., 2007). Estos efectos no son consecuencia de modificaciones en el EE y la LA, sino de una mayor actividad del SNS. Además, se ha observado un dimorfismo sexual, ya que ratones machos pero no hembras, muestran mayor movilización de lípidos como sugiere la reducción de la tasa de intercambio respiratoria (Sainsbury et al., 2007). Además se ha visto que el receptor KOR está implicado en la acción orexigénica de ghrelin y MCH (Romero-Pico et al., 2013).





OBJETIVOS





A pesar de la relevancia de la nicotina modulando el gasto energético y la ingesta, así como sus efectos sobre sistemas de recompensa, se desconocen los mecanismos implicados en la acción de la nicotina sobre el balance energético y si podrían estar mediados, al menos en parte, por vías de señalización opioide que han sido relacionadas tanto con sistemas de recompensa como con el balance energético. En base a esta hipótesis, los objetivos de este trabajo fueron:

1) En los últimos años se ha demostrado que el *browning* del tejido adiposo es un mecanismo utilizado por distintos tipos de señales en la regulación de gasto energético. Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de la nicotina central sobre el *browning* en el tejido adiposo blanco, así como los mecanismos moleculares implicados.

2) Estudiar la implicación del receptor opioide en los efectos centrales de la nicotina sobre el tejido adiposo, así como los posibles núcleos hipotalámicos implicados.





MATERIALES Y MÉTODOS





7 MUESTRAS HUMANAS

En este trabajo se emplearon dos cohortes independientes (cohorte 1 n=25 y cohorte 2 n=56) que se estudiaron de acuerdo a su estatus de fumador. Los parámetros antropométricos (edad, sexo e IMC) y clínicos (colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, niveles circulantes de glucosa y cotinina) aparecen detallados en la (Tablas 2 y 3). Todos los sujetos proceden del Servicio de Endocrinología del Hospital de Girona Dr. Josep Trueta. Estos pacientes eran de origen caucásico y con una masa corporal estable durante al menos tres meses previos al estudio.

Tablas 2 y 3. Media \pm Desviación estándar para las variables con distribución normal y mediana (rango intercuartil) para variables de distribución no normal. Las variables cualitativas se expresan como frecuencia. IMC: índice de masa corporal, HDL: lipoproteína de alta densidad, LDL: lipoproteína de baja densidad. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando ANOVA de un factor con el test *post hoc* de Bonferroni.

Cohorte 1	No fumador	Fumador	Valor P
N	20	5	
Sexo (hombre/mujer)	3/17	2/3	
Edad (años)	39.05 \pm 8.9	39.80 \pm 6.14	0.8
IMC (kg/m ²)	36.35 \pm 9.39	38.50 \pm 7.30	0.6
Glucosa en ayunas (mg/dl)*	93.5 (80.2-102)	96 (87-131.5)	0.3
Colesterol total (mg/dl)	194.21 \pm 24.2	210.80 \pm 30.78	0.2
Colesterol-HDL (mg/dl)	57.20 \pm 11.55	63.75 \pm 11.08	0.3
Colesterol-LDL (mg/dl)	114.66 \pm 27.56	130.75 \pm 42.50	0.3
Triglicéridos en ayunas (mg/dl)*	93.5 (61.7-160.7)	114 (69-225)	0.4

Cohorte 2	No fumador	Fumador	Valor P
N	40	16	
Sexo (hombre/mujer)	11/29	5/11	
Edad (años)	46 \pm 5 8.1	48.3 \pm 8.8	0.5
IMC (kg/m ²)	36.6 \pm 11.7	34.5 \pm 12.8	0.5
Glucosa en ayunas (mg/dl)*	100.9 \pm 28.2	93.6 \pm 15.3	0.3
Colesterol total (mg/dl)	198.9 \pm 36.1	210.9 \pm 46.3	0.3
Colesterol-HDL (mg/dl)	52.8 \pm 14.8	45.5 \pm 13.8	0.1
Colesterol-LDL (mg/dl)	124.2 \pm 33.9	139.1 \pm 34.9	0.2
Triglicéridos en ayunas (mg/dl)*	109.1 \pm 51.8	131.2 \pm 69.7	0.2
Cotina en suero (ng/ml)	0	258.4 \pm 24.5	<0.0001

Tabla 4. Análisis de regresión multivariante para predecir la expresión génica de UCP1 en vWAT en los participantes de la cohorte 2 (N= 56).

vWAT UCP1 (RU)*	Model 1		Model 2		Model 3	
	β	P	β	P	β	P
Edad (años)	0.9	0.5	-		0.06	0.6
IMC (kg/m ²)	-	-	0.21	0.1	0.19	0.1
Cotínina en suero (ng/ml)	0.28	0.03	0.28	0.03	0.27	0.04
R ² ajustada	0.058 (5.8%)		0.093 (9.3%)		0.079 (7.9%)	
P (modelo)	0.07		0.02		0.06	

El procedimiento se llevó a cabo durante el estado de ayuno. Los pacientes no presentaron ninguna enfermedad sistémica a parte de obesidad y estuvieron libres de infecciones durante el mes previo al estudio. Enfermedades en el hígado, específicamente tumores e infección por el virus de la hepatitis C (HCV, *hepatitis C virus*), y disfunción tiroidea fueron excluidas específicamente.

Todos los pacientes dieron un consentimiento informado por escrito, después de que el objetivo del estudio les fuera explicado, validado y aprobado por el Comité Ético y el Comité para la Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta. Las muestras y datos de los sujetos incluidos en el estudio fueron en parte provistas por el FATBANK, la plataforma promovida por el CIBEROBN y coordinada por el IDIBGI Biobank (Biobank IDIBGI, B.0000872), que está integrado en la Red de Nacional de Biobancos de España. Estas muestras se procesaron siguiendo los procedimientos operativos estándar con la aprobación correspondiente por parte del paciente (consentimiento informado) y también del Ethic External Scientific Committee y el Ethic FATBANK Internal Scientific Committee. Certificamos que todas las regulaciones institucionales aplicables respecto al uso ético de información y muestras de humanos voluntarios fueron seguidas durante este estudio.

Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron durante procedimientos quirúrgicos opcionales como colecistectomía, cirugía de hernia abdominal o cirugía de *by-pass* gástrico. Las muestras de WAT fueron transportadas inmediatamente al laboratorio (5-10 min). El manejo del tejido se llevó a cabo bajo condiciones asépticas estrictas. Las muestras de WAT se lavaron en PBS, se cortaron con fórceps y escalpelo en trozos pequeños de 100 mg, y de forma inmediata se congelaron en nitrógeno líquido para luego almacenarlas a -80°C. La medición de cotínina en suero se hizo con un kit de ELISA (KA0930, Abnova; Taipei City, Taiwan) para cotínina siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todos los datos procedentes de humanos fueron obtenidos por Grupo de Investigación del Dr. José Manuel Fernández Real del Departamento de Diabetes, Endocrinología y Nutrición, en el Hospital de Girona Dr. Josep Trueta, Institut D'investigació Biomèdica de Girona (IdIBGi) y la Universidad de Girona.

8 MODELOS ANIMALES

8.1 LEGISLACIÓN

Los procedimientos experimentales y los protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la realización de esta tesis doctoral se efectuaron de acuerdo al Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela, siendo responsable Miguel A. López Pérez con los números de procedimiento ID 15005AE/10/FUN/FISIO2/MLP2 e ID 15010/14/006, y actuando siempre conforme la normativa vigente:

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

Según el artículo 5 del Real Decreto 53/2013, el uso de animales en procedimientos está contemplado en investigación fundamental e investigación aplicada con fines científicos. Durante el desarrollo de esta tesis se ha puesto especial cuidado en cumplir lo expuesto en el artículo 4, que trata sobre los principios de reemplazo, reducción y refinamiento. Esto es, reducir al mínimo el número de animales de experimentación empleado en los procedimientos y evitando la duplicación de experimentos, sin comprometer por ello los objetivos del proyecto. Así mismo, el alojamiento, el cuidado y los métodos de los procedimientos se han realizado buscando disminuir el estrés o sufrimiento en los animales para garantizar al máximo su bienestar.

8.2 MODELOS ANIMALES

En la realización de los procedimientos se emplearon:

- 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 200-250 gramos aproximadamente (8-10 semanas).

2) Ratones macho adulto de la cepa C57BL6 y ratones macho adulto (*Oprk1*^{-/-}) *knock-out* para subtipo 1 (κ 1) del receptor κ opioide (KOR KO, *kappa opioid receptor knock-out*) (8-12 semanas) (Romero-Pico et al., 2018).

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

Durante este tiempo, se mantuvo a los animales en condiciones de acceso libre a dieta estándar (SD, *standard diet*) (STD, SAFE A04: 3,1% fat, 59,9% carbohydrates, 16,1% proteins, 2.791 kcal/g; Scientific Animal Food & Engineering; Nantes, Francia) y agua. Para verificar el correcto bienestar de los animales, estos fueron monitorizados de forma periódica mediante el seguimiento de la masa corporal y la ingesta empleando una balanza de precisión. Estas mediciones se realizaron diariamente durante la duración total del experimento concreto. Además, se valoró su aspecto físico y se procedió a acostumarlos al manejo por el personal del laboratorio para reducir en todo lo posible el estrés que se genera durante los procedimientos.

La estabulación de los animales fue individual o colectiva en función de las características de cada procedimiento, siempre considerando el comportamiento social de los roedores. De este modo, en la mayor parte de los experimentos en los que fue necesario un seguimiento de la masa corporal o ingesta, los animales se estabularon individualmente, aunque nunca por períodos superiores a 14 días.

9 ANESTESIA Y ANALGESIA

Los animales de experimentación recibieron anestesia general mediante una inyección intraperitoneal (IP) antes de comenzar con los procedimientos quirúrgicos. Con las ratas se empleó una disolución con un 42,5% de ketamina (*Imalgene 1000 inyectable*, Merial, Barcelona, España), 20% xilacina (*Rompún 2%*, Bayer Health Care, Berlin, Alemania) y 37,5% de suero salino fisiológico (*Suero fisiológico isotónico*, Physan, Madrid, España). La dosis que se administró fue de 200 μ l/100g de masa corporal. Para los ratones se utilizó una composición de 13,8% de ketamina, 3,45% de xilacina y 82,75% de suero salino, siendo la dosis 100 μ l/10g de masa corporal.

Para garantizar la profundidad de la anestesia se tomó como referencia la ausencia del reflejo podal y palpebral en los dos modelos animales. La pérdida de ambos reflejos nos indica el momento en que podemos iniciar el procedimiento quirúrgico.

Los animales recibieron ketoprofeno (*ketoprofeno-Orudis 100 mg*, Sanoli aventis, Barcelona, España) por vía subcutánea (SC) como analgésico al finalizar el procedimiento. La dosis que se administró fue de 2,5 mg/Kg de masa corporal.

10 VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

10.1 VÍA SUBCUTÁNEA (SC)

Se accede por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de la pata. Si el animal está despierto, primero se inmoviliza con la ayuda de un trapo cubriéndole la cabeza. A continuación se pellizca el lomo del animal con la misma mano y con la otra se introduce la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm*, BD Medical Surgical Systems) acoplada a una jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile*, BD Medical Surgical Systems) de forma paralela a la columna vertebral. Este procedimiento no requiere de anestesia y se puede emplear de forma continuada durante varios días.

Las mini bombas osmóticas (*Model 1002, Alzet*, DURECT Corporation; Cupertino, CA, EEUU) se colocan debajo de la piel del lomo del animal y permiten una administración subcutánea con un flujo constante. Según las indicaciones del fabricante, la sustancia se inocula a un ritmo de 0,5µl/hora aproximadamente durante 14 días. Es un procedimiento quirúrgico que requiere de anestesia para implantar la bomba.

10.2 VÍA INTRAPERITONEAL (IP)

Se realiza por la parte ventro-caudal del animal atravesando el peritoneo. La rata o el ratón se sujetan por la parte posterior para inmovilizarlo. En el caso de la rata se oprimen también las extremidades anteriores de forma firme para evitar que se mueva, y se le puede sujetar la cola para que no interfiera al introducir la aguja. Es recomendable inclinar ligeramente al animal hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en las vísceras, ya que por su propio peso éstas se desplazarán en esa dirección. La aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm*, BD Medical Surgical Systems) se inserta acoplada a una jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile*, BD Medical Surgical Systems) prácticamente de manera perpendicular al animal, preferiblemente por su costado derecho.

Esta vía de administración no requiere de anestesia previa para la inoculación de sustancias. Es nuestra vía de elección para anestesiarse a los animales (dosis detallada en la sección anterior).

10.3 VÍA HIPOTALÁMICA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Consiste en la administración de sustancias a nivel cerebral, en núcleos hipotalámicos concretos, mediante el uso de coordenadas definidas para cada núcleo en el atlas estereotáxico de cerebro de rata (C, 2013). La referencia para obtener las coordenadas estereotáxicas es el bregma, un punto anatómico del cráneo situado en donde la sutura coronal se interseca perpendicularmente con la sutura sagital. A partir del bregma calculamos las coordenadas antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV) en función de nuestro núcleo de

interés. Siempre se inoculan los núcleos bilateralmente, en ambos hemisferios. Las coordenadas de los núcleos estudiados son las siguientes:

- VMH en rata: -2,4/3,2 mm AP (se realizaron dos inyecciones en cada VMH); \pm 0,6 mm L; 10,1 mm DV.
- LHA en rata: -2,85 mm AP; \pm 2 mm L; 8,1 DV.

Para realizar el procedimiento, las ratas anestesiadas se posicionan en un aparato de estereotaxia (*David Kopf Instruments*, Tujunga, CA, EEUU) (más detallado en Procedimientos quirúrgicos). Seleccionando las coordenadas concretas se inyecta la sustancia de interés mediante jeringuillas de microinyección (*Hamilton, Serie 700, modelo 7001, 1 μ l calibre 25*; Reno, NV, EEUU). Se inyecta 1 μ l por lugar de inyección con un flujo de 200 nl/min durante 5 minutos, y con una concentración de virus adeno-asociado (AAVs, *adeno-associated virus*) de 1x10⁹ copias/ μ l (Martins et al., 2016; Romero-Pico et al., 2018).

10.4 VÍA INTRACEREBROVENTRICULAR (ICV)

Consiste en inyectar una sustancia a través de una cánula que está fija en el cráneo del animal y que conecta con el tercer ventrículo del cerebro (detallado en procedimientos quirúrgicos). Con la ayuda de un trapo inmovilizamos al ratón agarrándolo por el cuerpo con una mano, sin apretar demasiado, y dejando sobresalir la cabeza. Con unas tijeras retiramos el sellado de la cánula antes de la primera inyección e introducimos una jeringuilla Hamilton (*Model 1702N 22s*, Hamilton, Reno, NV, EEUU) vaciando el líquido con cuidado. Al retirar la jeringa sujetamos el extremo de la cánula para evitar que se desplace. Este procedimiento no requiere de anestesia una vez implantada la cánula, y puede repetirse durante varios días consecutivos.

11 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

11.1 MONITORIZACIÓN DE LA INGESTA Y DE LA MASA CORPORAL

La masa corporal y la ingesta se determinaron mediante una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*, RADWAG, Radom, Polonia), llevando un registro diario durante 7 o 14 días, dependiendo del experimento. Las medidas se realizaron siempre en la misma franja horaria (entre las 17:00 y las 19:00 horas) y con los animales estabulados de forma individual.

11.2 MONITORIZACIÓN DEL GASTO ENERGÉTICO, COEFICIENTE RESPIRATORIO Y ACTIVIDAD LOCOMOTORA

El fenotipado metabólico se llevó a cabo mediante un sistema de calorimetría indirecto. Este se compone de jaulas individuales con un sistema de ventilación cerrado y unos sensores que registran el EE; el coeficiente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*), a

partir de los valores medidos de consumo de O₂ (vO₂) y producción de CO₂ (vCO₂); y la actividad locomotora (LA, *locomotor activity*) (*LabMaster*; TSE Systems; Bad Homburg, Alemania).

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. La tasa metabólica se midió durante 24-48h. El EE, RQ (VCO₂/VO₂) y la LA se registraron cada 30 min. Los animales estuvieron estabulados en adaptación al sistema durante una semana antes de comenzar las mediciones.

11.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

El análisis de la composición corporal se hizo a través de una técnica de resonancia magnética nuclear (NMR, nuclear magnetic resonance) (*Whole Body Composition Analyzer*; EchoMRI; Houston, TX, EEUU y *Bruker BioSpin*; Ettlingen, Alemania). Ambos son analizadores de composición corporal que miden la masa grasa y magra del animal. EchoMRI presenta tiempos de escaneado cortos y no es necesario anestesiarse al animal, sólo introducirlo en un adaptador correspondiente a su tamaño, sea rata o ratón. Se realizan tres medidas de cada animal y se calcula la media para disminuir las variaciones que puedan darse debido al movimiento de éste. Bruker BioSpin hace mediciones más largas por lo que los animales deben de estar anestesiados mediante anestesia inhalatoria para minimizar los posibles movimientos. La toma de imagen dura aproximadamente 15 minutos, y se toman dos imágenes con las que luego se calcula la masa grasa (Gonzalez-Garcia et al., 2018; Martinez-Sanchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Martins et al., 2016; Seoane-Collazo et al., 2018).

11.4 PREPARACIÓN DE MINI BOMBAS OSMÓTICAS

Se emplearon para la administración crónica de sustancias (*Model 1002, Alzet*, DURECT Corporation; Cupertino, CA, EEUU). Antes de la implantación en el animal, las bombas se rellenaron con la sustancia a inocular o con su vehículo correspondiente a modo de control. Al montar la bomba queda un orificio de salida en uno de los extremos. A continuación, se colocaron en un baño a 37°C durante toda la noche para conseguir su activación antes de implantarla en los animales, para que así comiencen a expulsar la sustancia una vez estén en su organismo.

12 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

12.1 CANULACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR

Para preparar las cánulas se emplearon tubos de polietileno (*BD Intradermic® Polyethylene tubing, Non-Sterile*, Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU) de 0,965mm de diámetro exterior, 0,58mm de diámetro interior para ratón (PE-50). Uno de los extremos del tubo se corta en bisel con un ángulo de 45° aproximadamente y con una longitud de 0,5mm. A una distancia del bisel de 2,5mm se coloca un tope para impedir que la cánula penetre más en el cerebro. El lado opuesto al bisel se sella para que no entre suciedad

hasta el momento de administrar el tratamiento. La longitud total de la cánula es de unos 2,5cm.

A los animales anestesiados se les practicó un corte transversal de aproximadamente 1,5cm en la piel de la cabeza, entre la altura de los ojos y las orejas, perpendicular a la sutura sagital. Posteriormente se separó el tejido subcutáneo del cráneo dejando al descubierto el bregma, que va a ser el punto de referencia. A continuación, se realizó una perforación en el cráneo (al lado derecho o izquierdo del bregma) con una broca quirúrgica a una distancia lateral de 1,2 mm de la sutura sagital y 0,6 mm posterior al bregma. Luego se introdujo la cánula en el orificio por el extremo biselado, de manera paralela al eje dorso-ventral del animal. Finalmente, se fijó la cánula al cráneo del ratón con adhesivo cianocrilato (*SuperGlue-3*, *Loctite*). Tras la canulación los animales se estabularon de forma individual y se dejó un periodo de recuperación de entre 3 o 4 días antes de proceder a la inyección de las sustancias.

12.2 ESTEREOTAXIA NÚCLEO-ESPECÍFICA

Tras anestesiar a los animales y comprobar que están profundamente dormidos, éstos se colocaron en el equipo de estereotaxia (*David Kopf Instruments*, Tujunga, CA, EEUU). Una vez inmovilizada la cabeza en el equipo se les realizó un corte transversal en la piel de la cabeza, entre la altura de los ojos y las orejas, para exponer el cráneo inmovilizado. Nos ayudamos de una pinza para mantener visible el cráneo y se eliminó el tejido subcutáneo para exponer la zona alrededor del bregma. Usando las coordenadas del bregma como referencia, se calcularon las coordenadas estereotáxicas para los distintos núcleos en 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 $\pm 0,6$ mm; eje dorso-ventral 10,1 mm.

- En el LHA se realizó una inyección en cada hemisferio cerebral siguiendo las coordenadas: eje antero-posterior -2,85 mm; eje lateral ± 2 mm; eje dorso-ventral 8,1mm.

Posteriormente se perforó el cráneo en cada punto de las coordenadas con una broca quirúrgica y se procedió a la inyección de la sustancia. En cada inyección se inoculó 1 μ l de sustancia con una jeringa (*Hamilton, Serie 700, modelo 7001, 1 μ l calibre 25*; Reno, NV, EEUU), durante 5 minutos, con una velocidad de administración de 200nl/min. Una vez terminada la inyección se suturó el corte en la piel del animal con seda de sutura (*Ethicon Mersilk Soie, Special 2-0*, Johnson and Johnson company, Alemania). Los animales se estabularon individualmente.

12.3 REGISTRO DE LA ACTIVIDAD SIMPÁTICA

Se realizó un registro multi-fibra de la actividad del SNS del nervio que inerva al tejido adiposo blanco subcutáneo (sWAT, *subcutaneous white adipose tissue*) en ratones. Se anestesió a los animales mediante inyección IP de ketamina (91mg/kg) y xilacina (9,1 mg/kg) y a continuación se mantuvieron anestesiados con α -cloralosa (dosis inicial: 25mg/kg, dosis sostenida: 50 mg/kg/h) mediante un catéter que se insertó en la vena femoral. Se canuló la tráquea para que los animales pudiesen respirar de forma espontánea aire enriquecido en O₂.

La temperatura rectal de los roedores se mantuvo a 37,5°C empleando una mesa de cirugía con temperatura controlada y una lámpara infrarroja.

Mediante un microscopio de disección, se identificaron las fibras que inervan al sWAT y se colocó cada una en un electrodo bipolar de platino-iridio. Se ancló cada electrodo a una sonda de alta impedancia (*HIP-511*, Grass Instruments, Warwick, RI, EEUU) y la señal del nervio se amplificó 105 veces con un pre-amplificador (*HIP-511*, Grass Instruments, Warwick, RI, EEUU). Después de la amplificación, la señal nerviosa fue filtrada a 100- y 1000-Hz con un sistema de análisis de señales nerviosas (*Model 706C*, University of Iowa Bioengineering; Iowa City, IA, EEUU). Luego la señal nerviosa se dirigió a un osciloscopio (*Model 54501A*, Hewlett-Packard; Palo Alto, CA, EEUU) 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, EEUU).

Las mediciones basales fueron realizadas durante un período de control de 10min. La actividad nerviosa del sWAT se midió durante las 4h siguientes a la inyección ICV de vehículo o nicotina. Para asegurar que el ruido eléctrico fuese excluido del análisis del flujo simpático, se corrigió cada registro por la actividad de fondo *post-mortem*.

Este protocolo experimental fue realizado por el Dr. Kamal Rahmouni, *Departments of Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa, 52242, EEUU*.

12.4 DISECCIÓN Y EXTRACCIÓN DE TEJIDOS

Al terminar cada procedimiento experimental, los animales son sacrificados por luxación cervical y posterior decapitación, según las normas y leyes de experimentación animal. De cada animal se extrajo el hipotálamo (VMH y LHA), núcleo estriado, corteza, BAT, tejido adiposo blanco gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), sWAT y tejido adiposo blanco visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*). Los tejidos se conservaron a -80°C hasta su procesamiento y análisis. En los casos en los que fue necesario hacer microdisección, se llevó a cabo bajo una lupa óptica de 20 aumentos. Para los análisis inmunohistoquímicos e histológicos las muestras fueron fijadas en formalina al 10% y luego parafinadas.

13 DISEÑOS EXPERIMENTALES

13.1 TRATAMIENTO CON NICOTINA SC EN RATAS

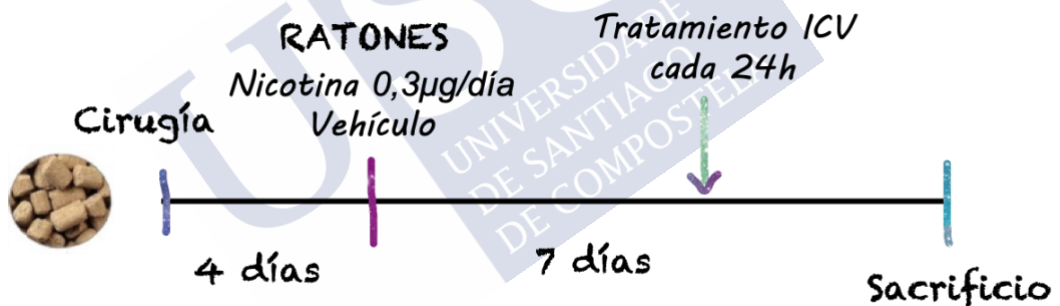
Los animales fueron divididos en dos grupos tras su semana de adaptación desde la llegada al animalario, con acceso libre a SD. Un grupo fue tratado con nicotina (*nicotine-hydrogen-tartrate salt, 2mg/kg*; Sigma; St. Louis, MO, EEUU) SC (n=16) y el otro con suero salino (n=17) SC, cada 12 horas (8:00 y 20:00 horas) en un volumen total de 100 µl, durante 8 días. Los 3 últimos días de tratamiento antes del sacrificio, una parte de los animales salino y

nicotina se introdujeron en el sistema de calorimetría indirecta (Martinez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014).



13.2 TRATAMIENTO CON NICOTINA CENTRAL ICV EN RATONES

Los ratones (C57BL6, animalario central) tuvieron una semana de aclimatación después de su llegada al animalario. Pasado ese período se les realizó una canulación ICV y se alojaron individualmente, dejándolos en reposo para recuperarse de la cirugía 4 días. A continuación, se dividieron en dos grupos, uno tratado con nicotina (*nicotine-hydrogen-tartrate salt*, 0,3µg/day; Sigma; St. Louis, MO, EEUU) y otro con vehículo (3µl de suero salino) ICV diariamente y a la misma hora (19:00 horas) durante 7 días.



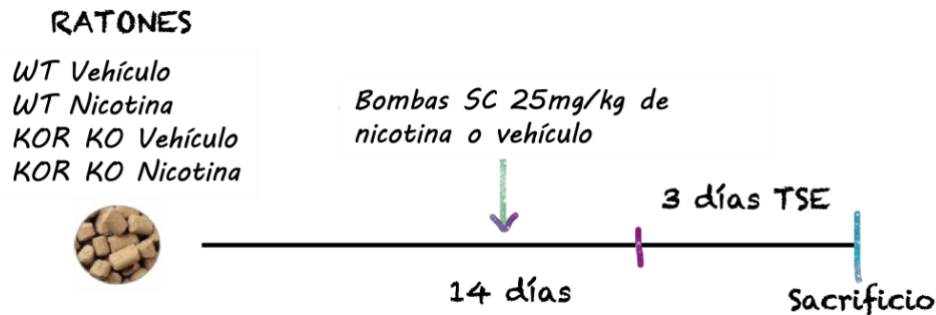
13.3 TRATAMIENTO CON NICOTINA EN BOMBAS SC EN RATONES KOR KO

Los ratones se dividieron en los siguientes grupos:

- WT Vehículo
- WT Nicotina
- KOR KO Vehículo
- KOR KO Nicotina

A continuación, se les implantó la bomba (*Model 1002, Alzet, DURECT Corporation; Cupertino, CA, EEUU*) previamente preparada y activada para que comience el flujo en cuanto se coloca en el animal. Las bombas contenían una dosis de 25 mg/kg de nicotina (*nicotine-hydrogen-tartrate salt*, Sigma; St. Louis, MO, EEUU) o suero salino como vehículo.

Los ratones se individualizaron y se les registró la masa corporal y la ingesta durante 14 días. Los últimos días de tratamiento parte de los animales de cada grupo se introdujo en el sistema de calorimetría.

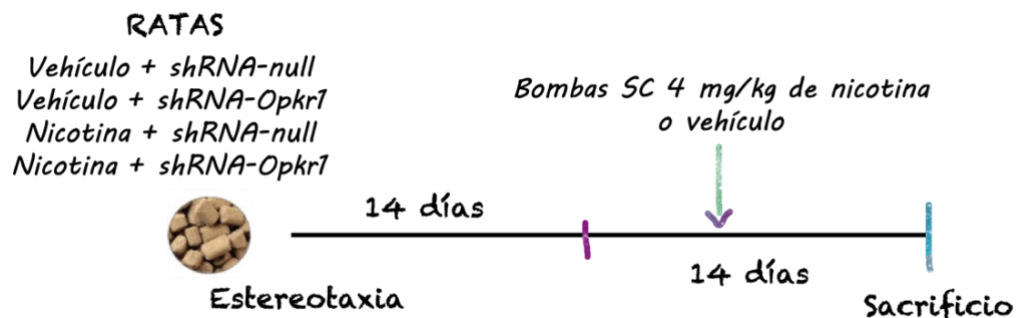


13.4 TRATAMIENTO CON AAVs PARA SILENCIAR OPKR1 EN RATA EN VMH Y LHA

A las ratas se les practicó una estereotaxia nucleoespecífica y se les inyectaron AAVs (1×10^9 partículas virales/ μ l) que codifican o no ARN de silenciamiento (shRNA, *short hairpin RNA*) de KOR para silenciar específicamente la expresión de ARNm de *Opkr1* en ratas, tanto en VMH como en LHA en dos experimentos distintos. Una vez realizada la estereotaxia, los animales se estabularon individualmente y se esperó 14 días para colocar subcutáneamente las mini bombas (*Model 2002, Alzet, DURECT Corporation, Cupertino, CA, EEUU*). Estas contenían una dosis diaria de 4 mg/kg de nicotina (*nicotine-hydrogen-tartrate salt, Sigma; St Louis, MO, EEUU*) o salino como vehículo durante 14 días (Romero-Pico et al., 2013).

Los grupos fueron los que se especifican a continuación:

- Vehículo + shRNA-null
- Vehículo + shRNA-*Opkr1*
- Nicotina + shRNA-null
- Nicotina + shRNA-*Opkr1*



14 TÉCNICAS ANALÍTICAS

14.1 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

14.1.1 Extracción de proteína

Las muestras de tejido se mantuvieron en hielo seco durante su manipulación y se seleccionó un trozo para ser procesado, guardando el resto de nuevo a -80° . El tejido cortado se introdujo en un tubo de seguridad de 2 ml (*Safe-Lock Tubes 2,0 ml*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con una cantidad apropiada (Tabla 4) de tampón de lisis (Tabla 5) dependiendo del tejido del que se fuera a extraer proteína (volumen entre 200 μ L y 1000 μ L) 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 homogenización se utilizó un homogeneizador mecánico (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, EEUU) durante 4 min a 30Hz. Posteriormente se centrifugaron en frío (4°C) a 13200rpm durante 30 min. Una vez centrifugadas las muestras, se extrajo el sobrenadante y se introdujo en otro tubo descartando el precipitado. En el caso de WAT y BAT se realizó una centrifugación previa de 10 minutos para eliminar mejor la grasa.

Tabla 4. Cantidad de tampón de lisis para cada tejido.

Tejido	Volumen
VMH rata	180 μ l
BAT (rata/ratón)	0,6/1 ml
LHA rata	200 μ l
Hipotálamo ratón	200 μ l

Tabla 5. 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
Ortavanadato 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	

14.1.2 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 μl de muestra a los que se les agregó 250 μl 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, EEUU) (Tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de la recta de calibrado.

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

La placa de lectura para el espectrofotómetro (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer*, Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) se preparó cargando en cada pocillo y por duplicado 10 μl 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 μl de solución Bradford (*dilución 1:4, Bio-Rad Protein Assay*, Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) previamente incubada a 37°C durante 10 min protegida de la luz. Una vez introducida en el espectrofotómetro se incubó toda la placa durante 5 min a 37°C y se mide la densidad óptica a una longitud de onda de 595nm, determinando la reacción colorimétrica en la cual las muestras más concentradas en proteína tienen mayor densidad óptica. Para la cuantificación de la concentración de proteína de las muestras se empleó el software Magellan 6. A través de la extrapolación de los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra. Una vez determinada la cantidad de proteína de cada muestra se prepararon alícuotas a la concentración necesaria para cada análisis (10-20 $\mu\text{g}/16 \mu\text{l}$).

14.1.3 Western blot

Preparación de geles

Para separar las proteínas se utilizaron geles de electroforesis Tris/glicina SDS-Poliacrilamida, en distintas concentraciones. En primer lugar, se preparan las carcasas verificando que no exista fuga de líquido. A continuación, se prepararon los geles separadores (Tabla 7a-b). Para nivelar el borde superior y eliminar las burbujas de la superficie se añade isopropanol al 60% en la parte superior del gel separador. Una vez que gelifican se elimina el isopropanol y se lava con agua destilada varias veces. Los geles concentradores se prepararon (Tabla 8a-b) después de secar el exceso de agua destilada del lavado y se agregaron sobre los geles separadores. Inmediatamente se colocan los peines para formar pocillos en los que se van a cargar las muestras. Estos se extraen una vez que polimerizaran los geles.

Tabla 7a. Preparación gel separador de electroforesis de 6'5%.

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

Tabla 7b. 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 8a. Preparación gel concentrador 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 8b. Preparación de tampón A y tampón B.

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	

Preparación de muestras para electroforesis

Con los datos obtenidos del análisis espectrofotométrico se calcularon las proporciones de cantidad de muestra, tampón de carga 1x (Tabla 9) y tampón de lisis con inhibidor de proteasa necesarias para preparar las alícuotas. Posteriormente se cargan en cada pocillo del gel, teniendo en cuenta las diluciones previamente realizadas. Para cada tejido se ajustó la cantidad de proteína más adecuada para el análisis por western blot (Tabla 10).

Tabla 9. Tampón de carga 5X.

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 10. Proporción de proteína cargada en cada pocillo.

Tejido	
VMH	10 μ g
BAT	15 μ g
Hipotálamo	10 μ g
LHA	10 μ g

Electroforesis

Para separar las proteínas a lo largo del gel, se colocaron las 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 11) en 400 ml de agua destilada) y asegurándose de que los geles quedan perfectamente sumergidos en el tampón. Las muestras se incuban a 95°C durante 5 min y luego se llenan los pocillos con 16 μ l de muestra, dejando el primer pocillo libre para cargar 5 μ l de marcador de pesos estándar para gel (*Precision Plus Protein, cat 161-0374 Bio-Rad*). Se coloca la tapa de la carcasa con los electrodos y se conecta a una fuente de alimentación a un voltaje constante de 130V. Se deja transcurrir la electroforesis hasta que el frente de migración llegue hasta aproximadamente 1 cm del borde inferior de gel, aproximadamente 1 hora y 15 minutos.

Tabla 11. Composición del tampón de electroforesis 5X.

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

Transferencia del gel de electroforesis a una membrana

El siguiente paso consiste en trasladar las proteínas del gel a un medio sólido como la membrana de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*, Millipore, Burlington, MA, EEUU). Se preparó papel absorbente (*Extra thick Blot Paper*, Bio-Rad, EEUU) y se sumergió en tampón de transferencia 1X (Tabla 12a-b). Se cortaron las membranas PVDF con unas medidas un poco mayores al tamaño de gel (8,5x7,1 cm) y se activaron, sumergiéndolas en depósitos con metanol, agua y tampón de transferencia 1X durante 5 min en cada uno. A continuación, se colocó el papel absorbente en el (*Extra thick Blot Paper*, Bio-Rad, EEUU), luego se colocaron encima las membranas de transferencia y sobre ellas los geles. Finalmente se coloca otra pieza de papel absorbente sobre ellos,

eliminando en cada paso las burbujas de aire. Se cierra el Trans-blot y se conecta a una fuente de corriente manteniendo el amperaje constante a 0'25A durante 1'40 horas.

Tabla 12a. Composición tampón de transferencia 5X.

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 12b. Composición tampón de transferencia 1X.

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

Inmunodetección

Cuando finaliza la transferencia se retiran las membranas y se bloquean con BSA en un depósito con BSA 3% (3g de BSA en 100ml de TBS-TWEEN (Tabla 13a-b) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se cortan las membranas para aislar las proteínas de interés que luego vamos a incubar, usando como guía el marcador de pesos moleculares. Cada fragmento de membrana se incuba con su anticuerpo primario correspondiente diluido en BSA-TWEEN (Tabla 14) durante 1 hora en agitación y temperatura ambiente (en el caso de UCP1, α -tubulina y β -actina) o durante toda la noche a 4°C.

Una vez incubado con el anticuerpo primario, éste se retira y se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN, para eliminar su exceso. A continuación, se incuban los fragmentos de membrana con el anticuerpo secundario diluido en BSA-TWEEN, durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, se elimina el anticuerpo secundario y se realizan de nuevo tres lavados de 5 minutos con TBS-TWEEN.

Tabla 13a. Composición TBS 10X.

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

Tabla 13b. Preparación TBS-TWEEN.

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

Tabla 14. Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
α -tubulina	1:5000	Sigma	T5168; RRID: AB_330337
β -actina	1:5000	Sigma	A5316; RRID: AB_673047
Rabbit monoclonal Anti-phospho-AMPK α (Trh172)	1:2000	Cell Signaling Technology	25355; 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
α 7-nAChR	1:1000	Abcam	ab216485; RRID: AB_398276
α 4-nAChR	1:1000	Abcam	ab41172; RRID: AB_873899
α 3-nAChR	1:1000	Abcam	ab183097; RRID: AB_823545
β 4-nAChR	1:1000	Abcam	ab129276; RRID: AB_2293243
β 2-nAChR	1:5000	Abcam	ab41174; RRID: AB_2095847
KOR	1:1000	Sigma	SAB2501442 , RRID:AB_448977
MOR	1:1000	Abcam	ab17934; RRID: AB_2242950
DOR	1:1000	Sigma	SAB4502042 ; RRID: AB_10695864
UCP1	1:10000	Abcam	ab10983; RRID: AB_631364

Revelado

Para el revelado de las membranas se preparó el sustrato de revelado (*Pierce ECL Western Blotting substrate*, Thermo Scientific) diluido 1:1. Se sacan las membranas del TBS-TWEEN y se incuban cada fragmento con 1 ml de ECL durante 4 min en oscuridad, puesto que el sustrato es fotosensible. A continuación, se colocaron los fragmentos de membrana en un casete (*Hyperscassette*, Amersham biociencias GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) entre dos trozos de papel de acetato transparente, procurando eliminar las burbujas que se puedan llegar a formar encima de las membranas. El revelado se lleva a cabo en cámara oscura. Para ello se coloca una película de revelado sensible a la luz (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón) sobre el papel de acetato y se deja exponer entre 30 segundos y 5 minutos, dependiendo de la proteína en cuestión. Una vez expuestas, se sumergen las películas 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). Por último, se lavan en agua para eliminar los restos de las soluciones de revelado y fijado.

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

Cuantificación

La cuantificación se realizó midiendo la densidad óptica de la señal de cada muestra a partir de las películas de revelado escaneadas (*resolución 400 ppp, CanonScan 9900F*, Canon, Tokio, Japón), con el software informático ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, EEUU). A partir de la imagen escaneada, se selecciona un área fija rectangular con el ImageJ lo suficientemente grande para que quepan en ella cada una de las bandas de señal de las muestras. Se mide la densidad óptica total de ese recuadro y también se toma una medida de una zona de película de revelado limpia, sin muestra, para calcular la densidad óptica del fondo. Con estos datos se corrige la medición de cada rectángulo en el que se encuadra la muestra, restándole el fondo correspondiente para obtener el dato de la señal de la muestra. La señal de una proteína determinada se representa en función de la señal obtenida para el control (α -tubulina o β -actina) de esa misma muestra.

14.2 ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO POR PCR EN TIEMPO REAL

Extracción de ARN

Es necesario realizar todo este proceso manteniendo las muestras en hielo y realizando las centrifugaciones correspondientes a 4°C para evitar la degradación del ARN. Para extraer el ARN se homogeniza mecánicamente un pequeño fragmento de las muestras congeladas en 1 ml de Trizol (*TRIZOL Reagent*; Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) durante 3 min a 30Hz (*TissueLyser II*, Qiagen, Germantown, MD, EEUU). Luego se centrifugan las muestras a 12000 rcf durante 10 min y se aspira la fase intermedia. A esta fracción se le añaden 200 μ l de cloroformo (*Chloroform*, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y se mezcla durante al menos 15 segundos para asegurar que queda correctamente mezclado. Se deja reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga de nuevo a 12000 revoluciones durante 15 min.

Quedan 2 fases: una fase superior acuosa, donde se encuentra el ARN, y una fase inferior orgánica, que contiene proteínas y lípidos. Entre ambas se sitúa una inter-fase donde se localiza el ADN. Se aspira la fase superior para separar el ARN del resto de los componentes celulares y se le añaden 500 μ l de 2-propanol. A continuación, se mezcla asegurando que lo haga correctamente. Estas muestras se dejan reposar 10 min a -20°C para favorecer que el ARN precipite. Posteriormente se vuelven a centrifugar a 12000 revoluciones durante 10 minutos. Al acabar esta centrifugación se observa si existe precipitado y se elimina el sobrenadante. Se le añade a cada muestra 1 ml de etanol (*Ethanol absolute PA*, Applichem/Pancreac, Darmstadt, Alemania) al 70% en agua DEPC y se mezcla bien para lavar el precipitado. A continuación, se centrifuga de nuevo a 12000 rcf durante 5 minutos. Luego se elimina el sobrenadante y para minimizar la posible cantidad de etanol, se vuelve a

centrifugar 1 minuto a 16100 rfc y se elimina el sobrenadante con una pipeta. Finalmente, se resuspende el precipitado en agua DEPC calentándolo a 60 °C durante 10 min.

Cuantificación de ARN

La cuantificación de ARN de cada muestra se determina en un espectrofotómetro (*Nanodrop 2000*, Fisher Scientific, New Hampshire, EEUU) ajustado a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm nos proporciona la cantidad de ácidos nucleicos, mientras que la absorbancia a 280 nm nos indica la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determina mediante el ratio 260/280, considerándose el valor de 2 como valor ideal de pureza. Se prepararon alícuotas a una concentración de 500 ng/μl (para BAT, VMH y LHA) o 1 μg/μl (para WAT).

Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción se realiza en un volumen total de 30 μl. Es necesario preparar un control negativo (RT-) (30 μl de la mezcla de reacción excepto M-MLV, cuyo volumen es sustituido por H₂O MilliQ). Las muestras ya preparadas se incuban en un termociclador con los siguientes parámetros (Tabla 15). Para terminar, se mantienen las muestras a 4°C, si van a usarse inmediatamente, o congeladas a -20°C hasta su uso si no se van a emplear en un período corto.

Tabla 15. Programa termociclador para RT

50 min	37 °C
15 min	42°C
5 min	95°C

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, EEUU).
- 6 μl de mezcla de dNTPs (*dTTP, dCTP, dGTP, dATP*, con una concentración de 10 mM de cada uno) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 1,5 μl Mg₂Cl 50 mM (*Mg₂Cl 50 mM*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,17 μl de Random primers (*Random primers*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,25 μl inhibidor de RNasa (*RNaseOUT*, 40 U/μl Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 1 μl de M-MLV reversotranscriptasa (*M-MLV*, 200 U/μl, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- Ajustar con de H₂O DEPC (agua destilada con dietilpirocarbonato al 0.1%, dejar una noche a temperatura ambiente) para un volumen final de 30 μl.

PCR en Tiempo Real (TaqMan)

Como sistema de detección se emplearon las sondas TaqMan, que son sondas específicas marcadas con fluorocromos. Este sistema se basa en la transferencia de energía de fluorescencia mediante resonancia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre los dos fluorocromos. El fluorocromo usado para la PCR fue TAMRA, que tiene un máximo de emisión de 580 nm. El volumen final de reacción de PCR fue de 12 μl.

Componentes de la reacción de PCR en tiempo real:

- 2,92 µl H₂O-MilliQ.
- 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, EEUU).
- 2 µl de muestra (RT).

En la placa de medición se cargan por duplicado las muestras, una curva patrón para el gen estudiado, un control negativo (-RT) y un blanco. La curva patrón consta 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 de RT de cada muestra, siempre del mismo tratamiento o tejido). El análisis de los datos se realiza comparando el ratio entre un gen de referencia (*Hprt*) y el gen problema entre los diferentes grupos experimentales. En la (Tabla 16) se especifican los primers y sondas que se utilizaron para la PCR en tiempo real. Las condiciones de amplificación son las que se muestran en la (Tabla 17), en un sistema de PCR Tiempo Real (*7500 Real Time PCR System*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU).

Tabla 16. Primers y sondas para la PCR en tiempo real.

ARNm	GenBank		Secuencia
<i>Cidea</i> (ratón)	NM_007702.2	Sentido	5'-CCTACGACATCCGATGCACAA-3'
		Antisentido	5'-TCTGTGCAGCATAGGACATAAAC-3'
		Sonda	FAM-5'-CTTCAAGGCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3'-TAMRA
<i>Cidea</i> (rata)		Assay ID	ThermoFisher TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn04181355_m1
<i>Hprt</i>	NM_012583	Sentido	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		Antisentido	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Sonda	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTGTGAT-3'-TAMRA
<i>Ppargc1a</i>	NM_031347	Sentido	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Antisentido	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3'
		Sonda	FAM-5'-AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA-3'-TAMRA
<i>Ppargc1b</i>	NM_176075.2	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
<i>Ucp1</i> (rata)	NM_012682	Sentido	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCGCAGCCTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
<i>Ucp1</i> (ratón)	NM_009463	Sentido	5'-CGATGTCCATGTACACCAAGGAA-3'
		Antisentido	5'-GACCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Sonda	FAM-5'-ACCGACGGCCTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
<i>Prdm16</i>	NM_001177995.1	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Mm01266512_m1
<i>Tfam</i>		Assay ID	ThermoFisher TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00580051_m1

Tabla 17. Programa PCR en tiempo real

2 min	50 °C
10 min	95°C
15 seg	95°C
1 min	65°C
Repetimos secuencia durante 40 ciclos	

14.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Empleamos inmunohistoquímica (ICH, *immunohistochemistry*) para detectar en el propio tejido la presencia de determinadas proteínas y su localización. Se realizó inmunohistoquímica de sWAT, gWAT y vWAT de ratones y de gWAT de rata sobre muestras parafinadas. Los tejidos fueron extraídos y se fijaron mediante inmersión en formalina 10% durante 24 h. Posteriormente se deshidrataron para estudio histológico mediante un aumento de las concentraciones de alcohol, se montaron en xileno y se procedió con su inmersión en parafina. Los bloques de parafina se cortaron en rodajas en secciones de 3 μm . Éstos se procesaron, se desparafinizaron en xileno, se rehidrataron y se enjuagaron con agua destilada. Por último, se tiñeron para inmunohistoquímica de UCP1. Para ello, las rodajas se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario (UCP1, Abcam, Cambridge, Reino Unido), se lavaron y se 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, Japón) a 20x en rata y a 40x en ratón. Las imágenes se cuantificaron con el Frida Software: FRamework for Image Dataset Analysis (The Johns Hopkins University; Baltimore, MD, EEUU). El Frida Software es una herramienta de cuantificación de imágenes que realiza una medición automática de las fotografías en función de la cantidad existente de un color determinado. La tinción de UCP1 genera una coloración marrón en los cortes histológicos de grasa. Mediante el Frida Software se selecciona esa coloración marrón característica y el propio programa detecta y mide la cantidad de píxeles con ese color en el área total de la fotografía. Para cada animal se mide y se realiza la media de tres fotografías. La media de cada grupo se presenta como porcentaje en función del grupo control.

14.4 HISTOLOGÍA

Tinción hematoxilina/eosina.

Mediante esta técnica podemos estudiar las estructuras celulares de un tejido. Para ello se utilizaron muestras parafinadas tratadas con xilol, para eliminar los excesos de parafina. Después los cortes se sometieron a un proceso de rehidratación, que consiste en una batería de alcoholes a concentraciones decrecientes (100°, 95° y 70°). Tras lavar con H₂O destilada se sumergieron en hematoxilina durante 10 min, 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. Antes del montaje se sumergieron en xilol 10 min. Las imágenes se tomaron con una cámara digital Olympus XC50 (Olympus Corporation; Tokyo, Japón) a 20x en rata y a 40x en ratón. Las imágenes se cuantificaron con el software ImageJ-1.33 (NIH; Bethesda, MD, EEUU).

15 ESTADÍSTICA

Los datos extraídos de los procedimientos experimentales *in vivo* e *in vitro*, se presentan como porcentaje en función de su control. Se toma la media (M) como valor y la desviación estándar de la media (SEM) ($\text{media} \pm \text{SEM}$).

En los experimentos en los que se midieron parámetros como la ingesta de los animales y su masa corporal, los datos se representaron brutos sin realizar ninguna relación porcentual de comparación. El tamaño de muestra de las poblaciones de cada experimento se detalla en los pies de figura de los resultados. Para analizar los resultados se excluyeron las muestras y/o animales atípicos empleando el *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. Cuando durante un procedimiento experimental se observa un comportamiento anómalo en un animal como la no ingestión de alimentos, un mal aspecto externo, aparición de estereotipias o animales que presentan signos de dolor, este también se excluye.

Previo al análisis estadístico se realizó un test de normalidad, y para ello se utilizó el test Shapiro-Wilks (Kao & Green, 2008). En el caso de que las poblaciones analizadas mostraran una distribución normal se realizarían test estadísticos paramétricos. Cuando la población no superase el test de normalidad, se realizarían test estadísticos no paramétricos, algo que no fue necesario durante el análisis de los resultados de la tesis, por no darse este caso.

15.1 TEST PARAMÉTRICOS

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

15.1.1 ANOVA de una vía

El análisis de la varianza (ANOVA) se utiliza para determinar las diferencias entre las medias de tres o más grupos que siguen una distribución normal y son independientes entre sí. Existen diversos test que se pueden emplear:

- Tukey test, que compara dos medias simples cada vez y ejecuta todas las posibles comparaciones.
- Dunnett test, que se realiza cuando se comparan todas las medias con el grupo control, por lo que no es un procedimiento tan exhaustivo.

- Test de Bonferroni, que es el procedimiento más potente y su uso se recomienda cuando se compara entre más de tres grupos experimentales (Kao & Green, 2008).

15.1.2 T-test

Compara las medias de dos poblaciones desapareadas, teniendo en cuenta que siguen una distribución normal. Es un test robusto, ya que es capaz de comparar poblaciones con un $n \leq 5$ (JC, 2013). En un contraste de hipótesis bilateral (2 colas). En él se estudia la desigualdad entre las medias, siendo las regiones críticas del estadístico las correspondientes a la cola inferior y superior de la distribución. En un contraste unilateral (de una cola) la desigualdad en la hipótesis señala sólo en una 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 que no conocemos su efecto o no existe evidencia previa, realizamos t-test de dos colas. Por el contrario, 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 posibles efectos fisiológicos (Milton, 2007).

15.2 CORRELACIÓN BIVARIANTE

La correlación bivariante se basa en la asociación lineal, cuando aumentan los valores de una variable, los valores de la otra variable pueden aumentar o disminuir de forma proporcional. Existen dos grandes tipos de correlaciones: la correlación de Pearson y la correlación de Spearman. Estas dos correlaciones emplean fórmulas diferentes pero están basadas en la misma información. La correlación de Pearson es conveniente cuando las variables siguen una distribución normal (University), mientras que la correlación de Spearman es más adecuada cuando las variables no siguen una distribución normal (Stepanski, 2005).



RESULTADOS





Parte de los resultados expuestos en esta tesis han sido publicados dentro del siguiente artículo: *Central Nicotine Induces Browning Through Hypothalamic κ Opioid Receptor* (Seoane-Collazo et al., 2019).

1. LA NICOTINA PERIFÉRICA INDUCE *BROWNING* EN EL WAT

En un inicio se investigó el efecto que el tratamiento periférico con nicotina SC en ratas tiene sobre el balance energético. Se observó que la nicotina producía una disminución notable en la masa corporal de los roedores, apreciándose también efectos anorexigénicos, con una menor ingesta de alimentos que los animales del grupo vehículo (Fig.1 a, b).

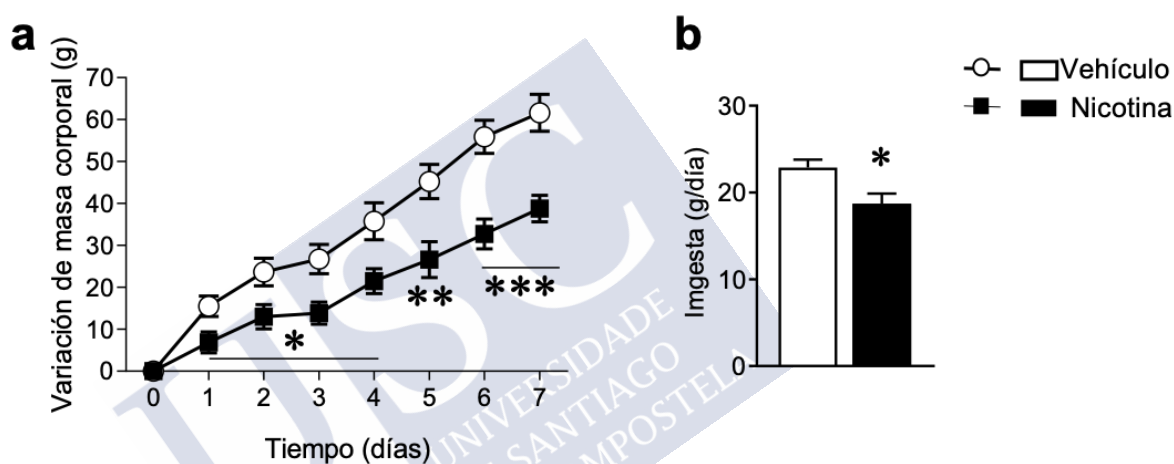


Figura 1. Efecto de la nicotina periférica sobre el balance energético en ratas. (a) Variación de masa corporal (vehículo n=8, nicotina n=8), (b) ingesta diaria (vehículo n=8, nicotina n=8) de ratas tratadas con nicotina o vehículo. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

Seguidamente decidimos valorar si la pérdida de masa corporal podría estar también influenciada por un incremento del gasto energético. Encontramos aumentos del EE y de la LA, además de la disminución del RQ de las ratas, que tiene que ver con la pérdida de masa de los animales. El RQ está relacionado de forma directa con el sustrato que se está metabolizando en un organismo en un determinado momento, y su valor oscila entre 0.7 y 1 según se estén metabolizando lípidos o carbohidratos. De este modo podemos inferir que las ratas tratadas con nicotina SC obtienen energía a partir del metabolismo de lípidos en mayor medida que sus respectivos controles y que presentan además una mayor actividad y EE, sobre todo al inicio de la fase oscura (Fig. 2 a-c). En el BAT también se apreciaron cambios en la expresión de la proteína UCP1 analizada por Western Blot, ya que ésta se encuentra aumentada tras el tratamiento SC con nicotina (Fig. 3).

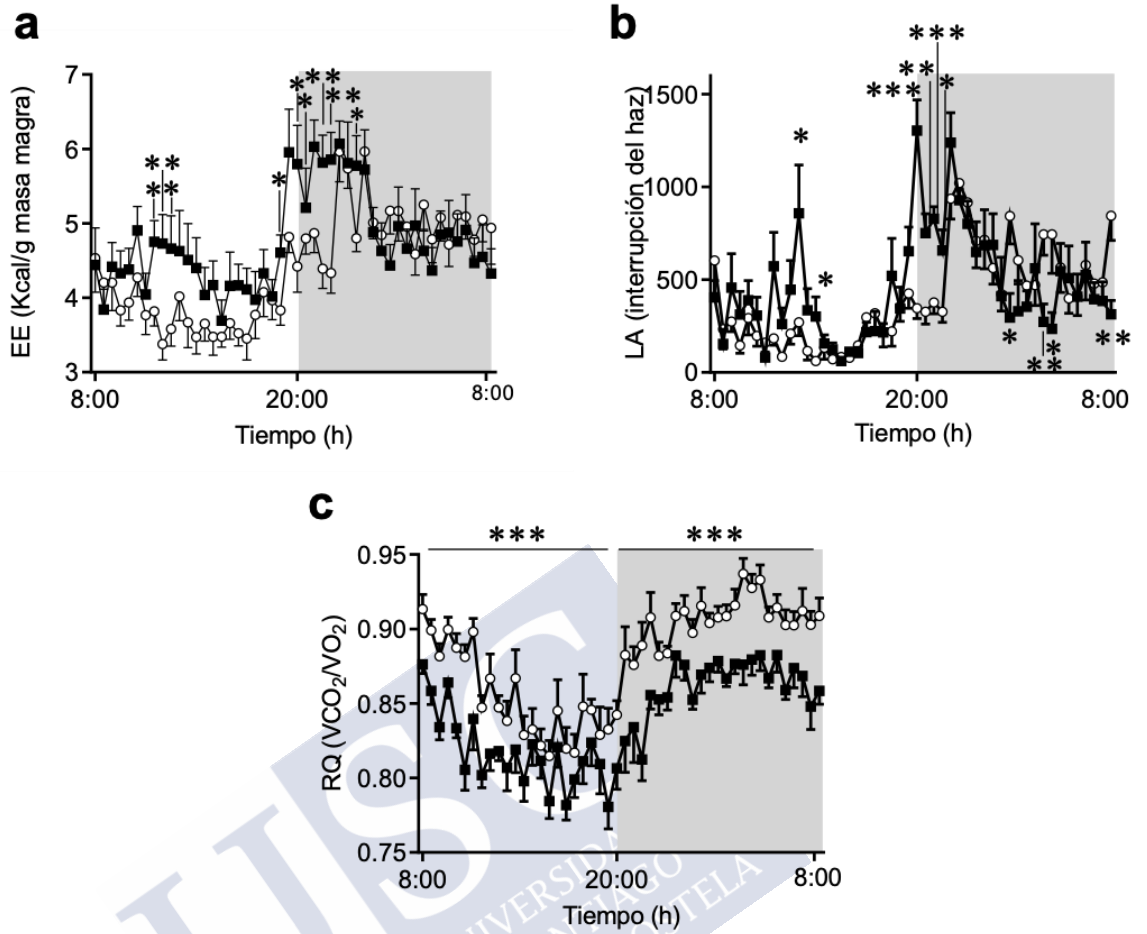


Figura 2. Efecto de la nicotina periférica sobre el gasto energético en ratas. (a) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (vehículo n=13, nicotina n=13), (b) actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (vehículo n=11, nicotina n=11) y (c) cociente respiratorio, RQ (*respiratory quotient*) (vehículo n=13, nicotina n=13) de ratas tratadas con nicotina o vehículo. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

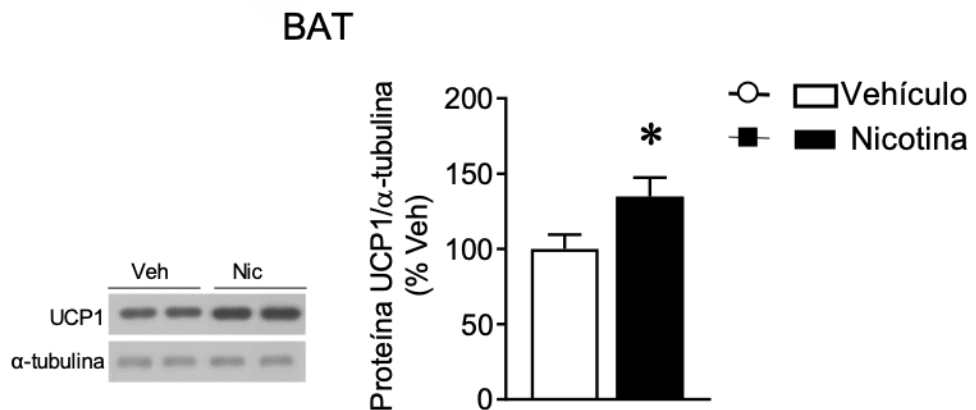


Figura 3. Efecto de la nicotina periférica sobre UCP1 en el BAT en ratas. Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (vehículo n=7, nicotina n=7) de ratas tratadas con nicotina o vehículo. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

Al comprobar que la nicotina SC en el BAT de las ratas aumentaba UCP1, una proteína vinculada con la termogénesis, se examinó también su capacidad para inducir *browning* en el WAT, analizando los distintos depósitos grasos. Las tinciones de hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica de UCP1 revelaron una reducción en el área de los adipocitos y un aumento en la expresión de UCP1, respectivamente, en los depósitos de grasa gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*) y grasa subcutánea (sWAT, *subcutaneous white adipose tissue*). En cuanto al tercer depósito analizado, grasa visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*), sólo se ha visto una disminución del tamaño de los adipocitos (Fig. 4 a-f). Ambos hallazgos apuntan a que el tratamiento con nicotina durante una semana es capaz de inducir *browning* en los depósitos grasos que fueron analizados.

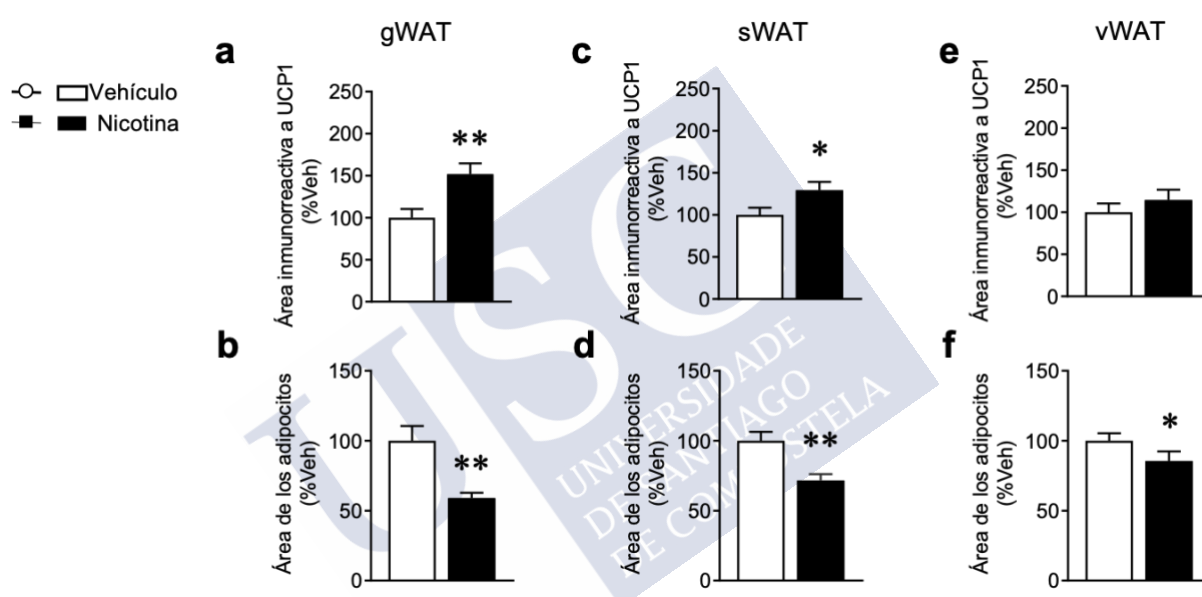


Figura 4. Efecto de la nicotina periférica sobre el *browning* en distintos depósitos grasos en ratas. (a) Área inmunorreactiva a UCP1 en gWAT (vehículo n=8, nicotina n=8), (b) área de los adipocitos en gWAT (vehículo n=8, nicotina n=8), (c) área inmunorreactiva a UCP1 en sWAT (vehículo n=14, nicotina n=13), (d) área de los adipocitos en sWAT (vehículo n=17, nicotina n=15), (e) área inmunorreactiva a UCP1 en vWAT (vehículo n=11, nicotina n=14), (f) área de los adipocitos en vWAT (vehículo n=15, nicotina n=16) de ratas tratadas con nicotina o vehículo. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

2. LA NICOTINA CENTRAL INDUCE *BROWNING* EN EL WAT

Una vez comprobado el efecto de la nicotina a nivel periférico, se decidió investigar su efecto central y observar si se mantiene la acción sobre el *browning* en el WAT de igual forma que con la administración SC. Este modelo presenta más similitudes con la forma de administración inhalatoria de esta sustancia en humanos, la más común, por la que la nicotina accede directamente al SNC.

Recurrimos de este modo a la inyección ICV de nicotina en ratones durante 7 días, la cual originó una anorexia muy marcada con la consecuente pérdida de masa corporal (Fig. 5 a, b), así como una disminución de los depósitos grasos de los animales (Fig. 5 c). Los análisis del WAT demostraron que la nicotina central incrementa de forma robusta la expresión de marcadores termogénicos en el gWAT (Fig. 6), indicativo de la formación de *browning*.

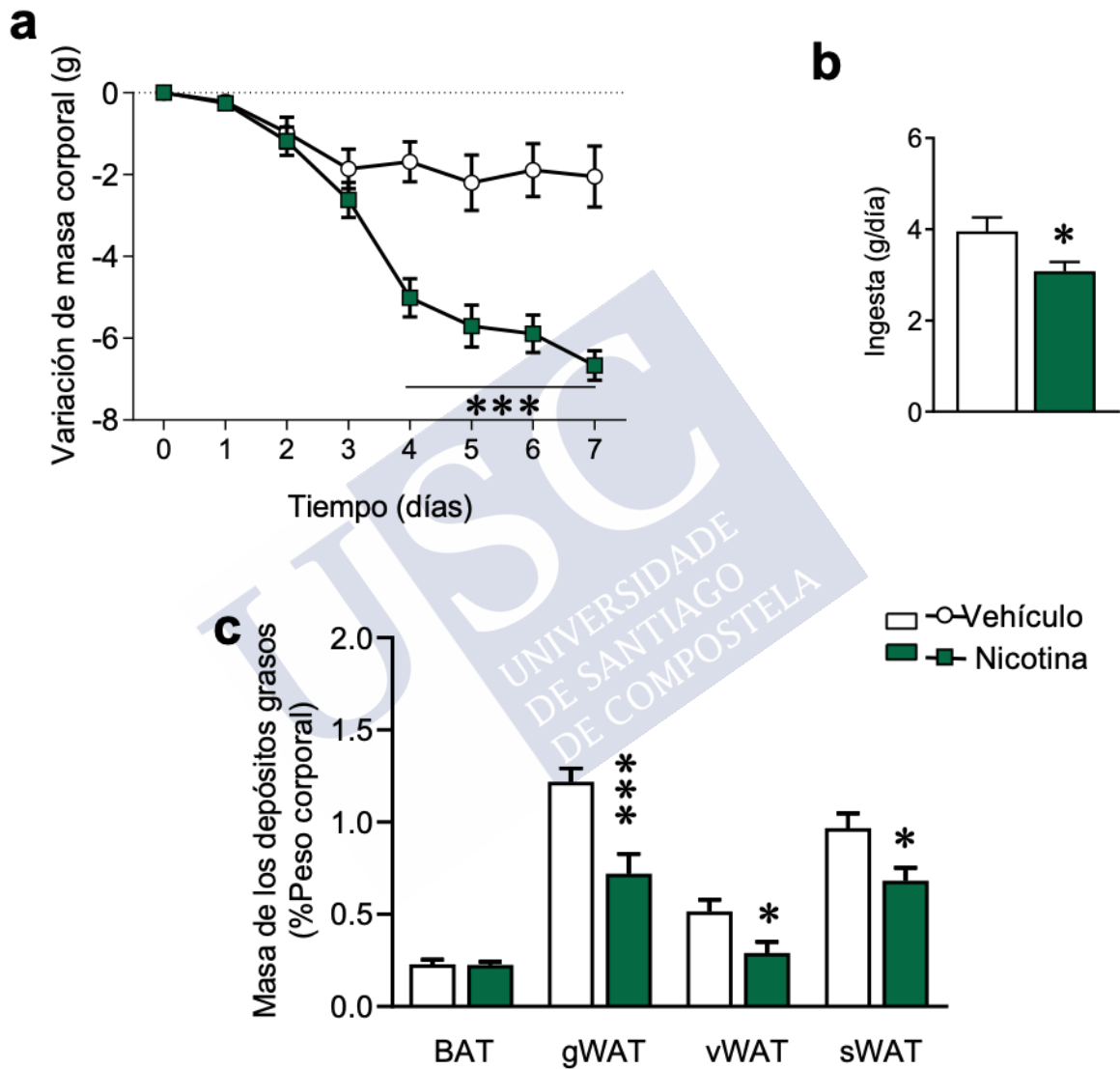


Figura 5. Efecto de la nicotina central sobre el balance energético en ratones. (a) Variación de masa corporal (vehículo n = 12, nicotina n = 16), (b) ingesta diaria (vehículo n = 12, nicotina n = 16) y (c) masa de los depósitos grasos (vehículo n = 10, nicotina n = 7) de ratones tratados ICV con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

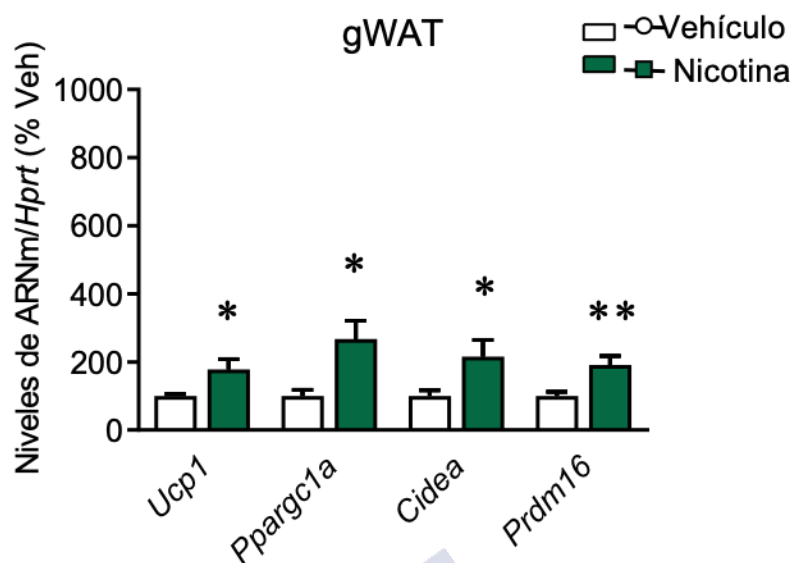
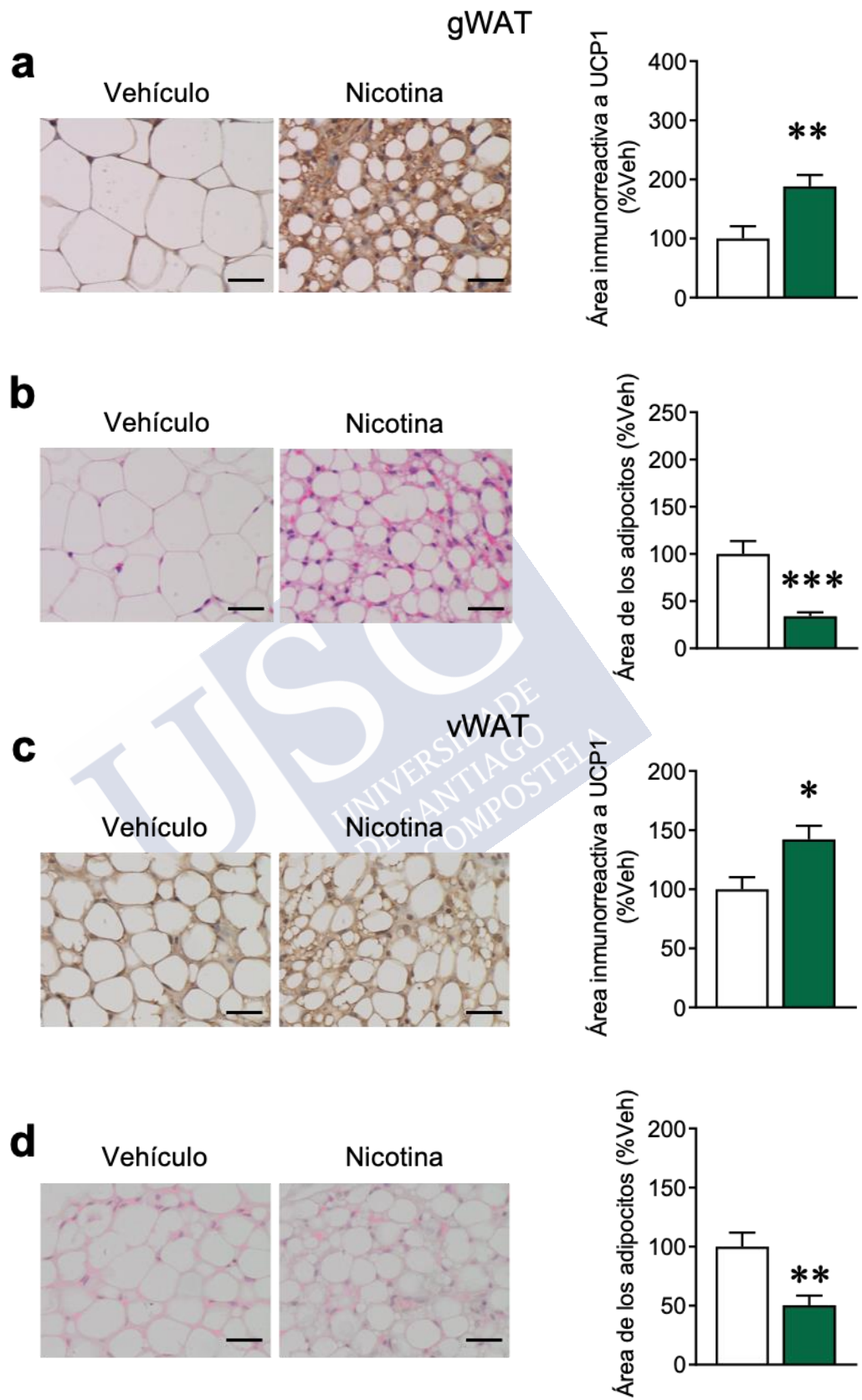


Figura 6. Efecto de la nicotina central sobre los niveles de ARNm de marcadores termogénicos en ratones. Niveles de ARNm de marcadores termogénicos en gWAT (vehículo n = 11, 11, 11, 12, nicotina n = 15, 16, 13, 15) de ratones tratados ICV con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

Al finalizar el tratamiento central con nicotina, también se analizó si existía presencia o no de *browning* en los depósitos grasos. Se comprobó mediante hematoxilina-eosina que el tamaño del área de los adipocitos en los tres depósitos grasos analizados disminuía y que, a su vez, esto venía asociado a un incremento en la inmunorreactividad a la proteína UCP1 mediante inmunohistoquímica de esos mismos tejidos (Fig. 7 a–f), confirmando así la existencia de *browning*.



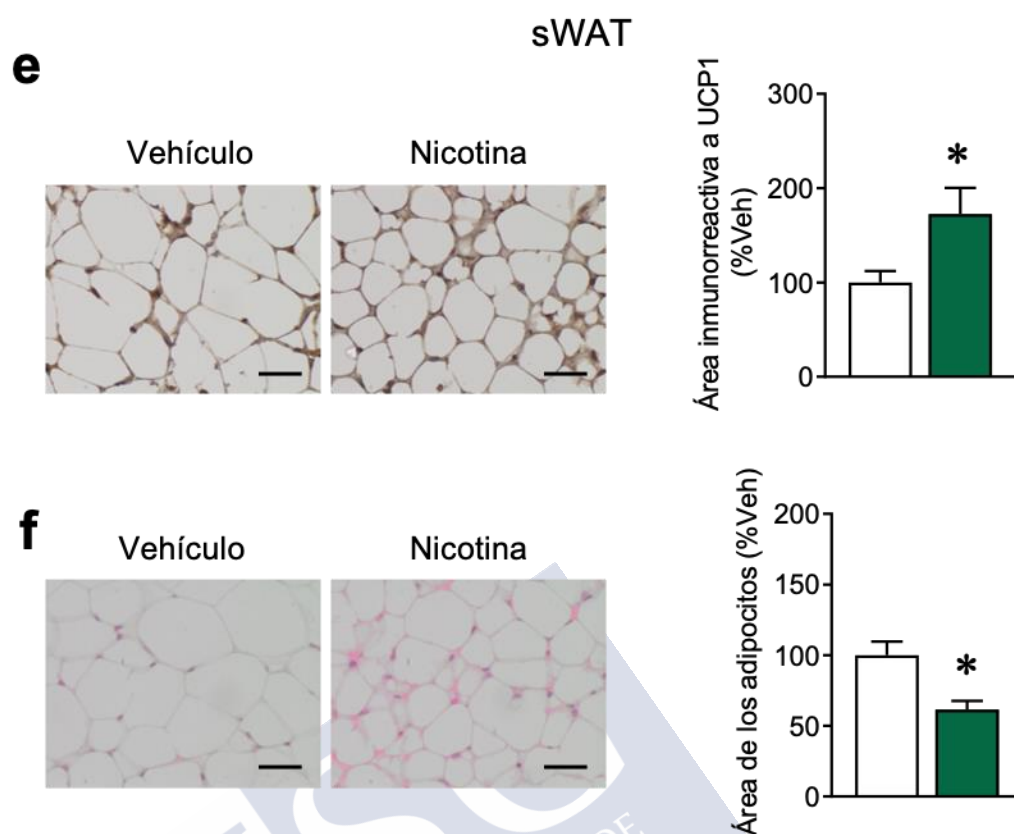


Figura 7. Efecto de la nicotina central sobre el *browning* en WAT en ratones. (a) Inmunohistoquímica de UCP1 (panel izquierdo 40×, barra de escala: 100 μ m) y área inmunorreactiva a UCP1 (panel derecho) en gWAT (vehículo n = 13, nicotina n = 14), (b) tinción hematoxilina-eosina (panel izquierdo 40×, barra de escala: 100 μ m) y área de los adipocitos (panel derecho) en gWAT (vehículo n = 13, nicotina n = 15), (c) inmunohistoquímica de UCP1 (panel izquierdo 40×, barra de escala: 100 μ m) y área inmunorreactiva a UCP1 (panel derecho) en vWAT (vehículo n = 10, nicotina n = 7), (d) tinción hematoxilina-eosina (panel izquierdo 40×, barra de escala: 100 μ m) y área de los adipocitos (panel derecho) en vWAT (vehículo n = 10, nicotina n = 7), (e) inmunohistoquímica de UCP1 (panel izquierdo 40×, barra de escala: 100 μ m) y área inmunorreactiva a UCP1 (panel derecho) en sWAT (vehículo n = 10, nicotina n = 6), (f) tinción de hematoxilina-eosina (panel izquierdo 40×, barra de escala: 100 μ m) y área de los adipocitos (panel derecho) en sWAT (vehículo n = 10, nicotina n = 6) de ratones tratados ICV con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

La importancia del SNS en el control de la expresión de UCP1 y el desarrollo de *browning*, nos llevó a considerar la posibilidad de que la nicotina podría inducir una activación simpática de los nervios que inervan al WAT. De acuerdo con esta premisa, se observó que la administración ICV de nicotina incrementó de forma importante el tráfico de los nervios simpáticos hacia sWAT, grabados directamente por microneurografía (Fig. 8 a, b). El aumento en el tráfico de los nervios simpáticos en el WAT debido a la nicotina ICV fue dosis-dependiente, con la actividad simpática aumentando en un $66.7 \pm 26.5\%$ ($P < 0.01$) y $227.6 \pm 51.5\%$ ($P < 0.001$) 4 h después de inyectar 0.15 μ g y 0.3 μ g de nicotina ICV, respectivamente.

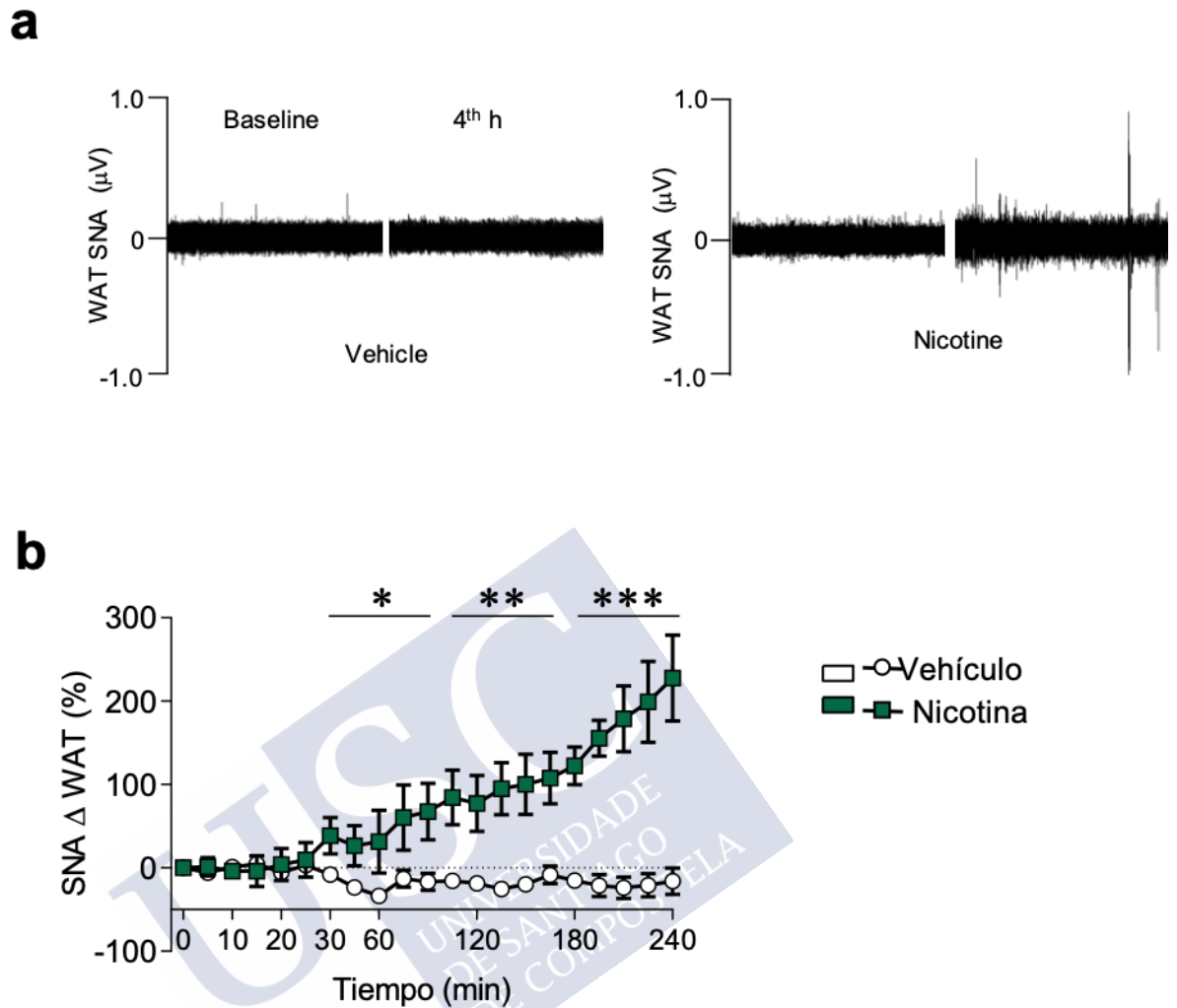
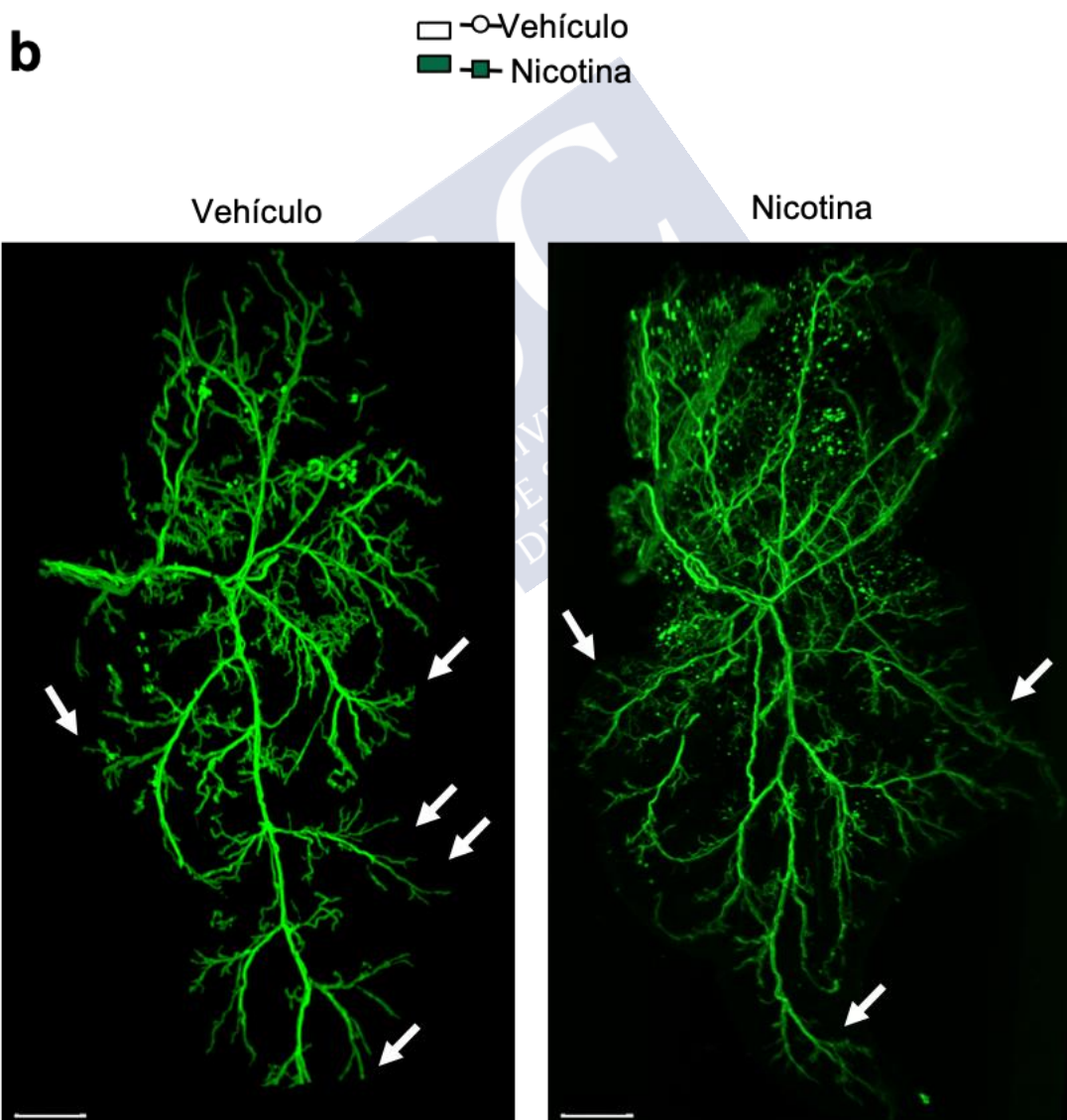
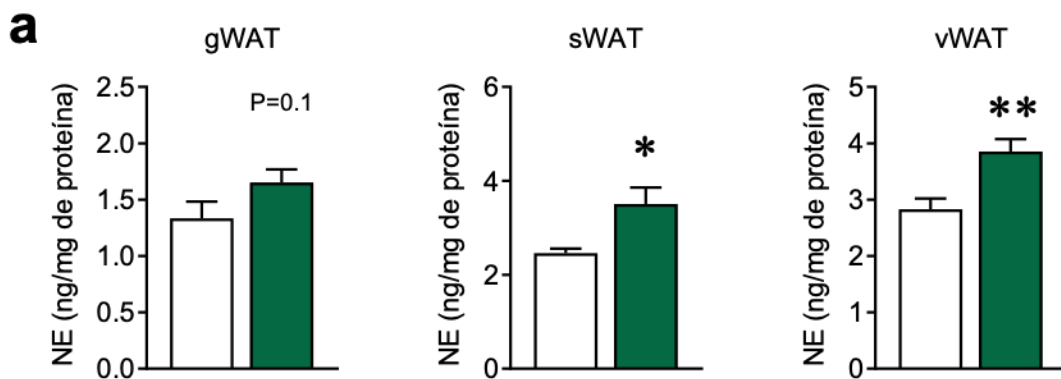


Figura 8. Efecto de la nicotina central sobre la innervación del SNS en ratones. (a-b) Actividad nerviosa simpática (SNA) registrada de los nervios que inervan al sWAT (vehículo n = 6, nicotina n = 5) de ratones tratados ICV con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

En relación con lo anterior, la nicotina central incrementó la concentración de NE en sWAT y vWAT (Fig. 9 a). Para estudiar si la nicotina puede modular el tono simpático en el WAT investigamos además su impacto en la densidad de las fibras del SNS que están inervando todo el depósito de gWAT. Usando inmunohistoquímica de tiroxina hidroxilasa (TH) acoplada a Adipo-Clear (Y. Cao, Wang, Wang, Han, & Zeng, 2018; Chi et al., 2018), nuestros datos mostraron una tendencia a incrementar la longitud, el área y el volumen de las dendritas inervando gWAT (Fig. 9 b) tras el tratamiento central con nicotina. Esto es indicativo de que además de promover cambios funcionales en la actividad simpática, la nicotina también provoca cambios en la plasticidad y arquitectura de las fibras simpáticas. En resumen, todos estos datos concuerdan con que la nicotina administrada centralmente ejerce su acción en el WAT a través de la activación del SNS. Estos análisis se realizaron en colaboración con el *Department of physiology anatomy and genetics* (Oxford, Reino Unido) de la Dra. Ana Domingos.



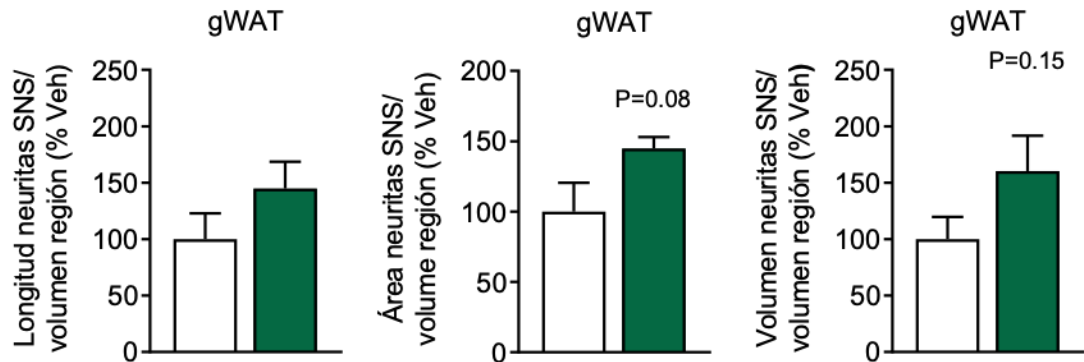


Figura 9. Efecto de la nicotina central sobre las fibras simpáticas en ratones. (a) Niveles de NE en gWAT, sWAT, y vWAT (vehículo n = 5, 6, 6, nicotina n = 7, 7, 7), (b) inmunohistoquímica de TH (panel superior, barra de escala: 1000 μ m) y cuantificación de la longitud, área y volumen de las neuritas del SNS (panel inferior) en gWAT (vehículo n = 4, nicotina n =4) de ratones tratados ICV con vehículo o nicotina. Las flechas blancas representan las dendritas. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

3. EL KOR ES NECESARIO PARA LA ACCIÓN DE LA NICOTINA SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO

Se conoce que el sistema opioide puede modular el balance energético. Un ejemplo de ello es que el bloqueo de KOR protege a los ratones contra el desarrollo de obesidad incrementando la termogénesis del BAT y, por consiguiente, el EE (Czyzyk et al., 2010).

Sin embargo sigue sin conocerse si KOR puede mediar o no las acciones de la nicotina sobre el *browning* del WAT. Para comprobarlo se empleó una aproximación experimental más robusta examinando el efecto de la nicotina en ratones KOR *knockout* (KO) y sus controles *wildtype* (WT). En los ratones WT, la nicotina disminuyó la masa corporal (Fig. 10 a, b) y la adiposidad (Fig. 11 a-d), sin embargo, este efecto no fue observado en los animales KOR KO. Estos cambios se asociaron a un mayor gasto energético (Fig. 12 a, b) en ratones WT pero no en los animales KOR KO.

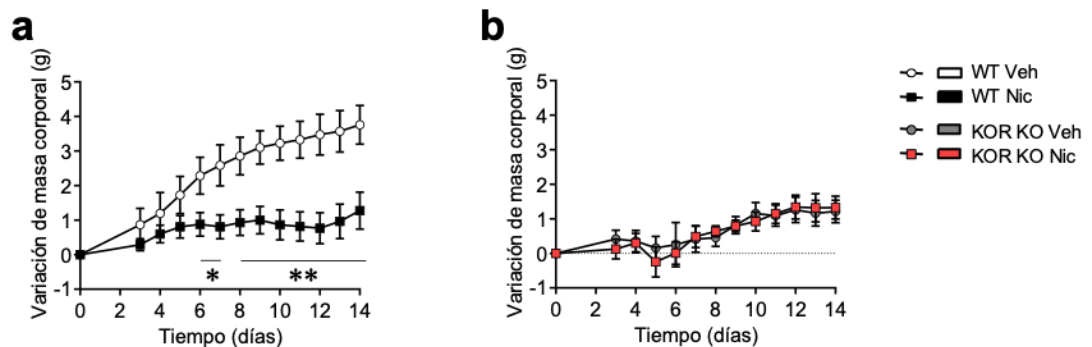


Figura 10. Efecto de la nicotina sobre el balance energético en ratones KOR KO. (a-b) Variación de masa corporal (WT vehículo n =12, WT nicotina n =14, KO vehículo n = 14, KO nicotina n = 13) de ratones WT o KOR KO tratados con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

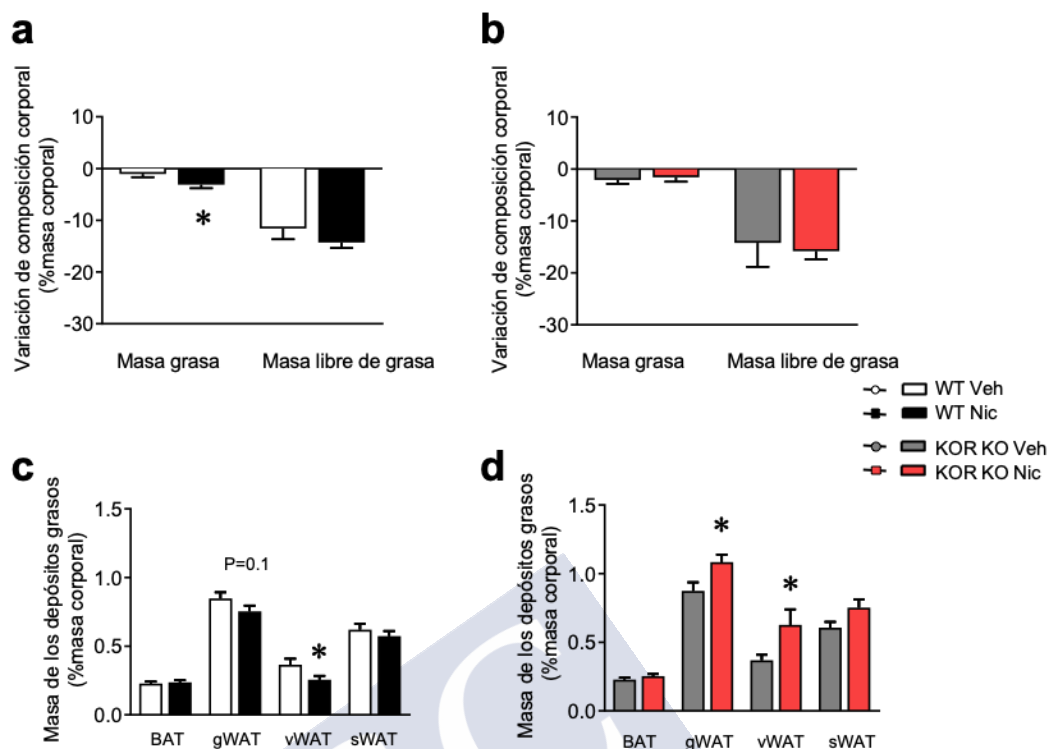


Figura 11. Efecto de la nicotina sobre la adiposidad en ratones KOR KO. (a-b) Composición corporal (masa grasa WT vehículo n = 10, WT nicotina n = 13, KO vehículo n = 8, KO nicotina n = 8; masa magra WT vehículo n = 10, WT nicotina n = 13, KO vehículo n = 5, KO nicotina n = 5), (c-d) masa de los depósitos grasos (WT vehículo n = 11, 11, 9, 11, WT nicotina n = 13, 13, 12, 13, KO vehículo n = 9, 9, 8, 9, KO nicotina n = 7, 7, 7, 7) de ratones WT (a,c) o KOR KO (b,d) tratados con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

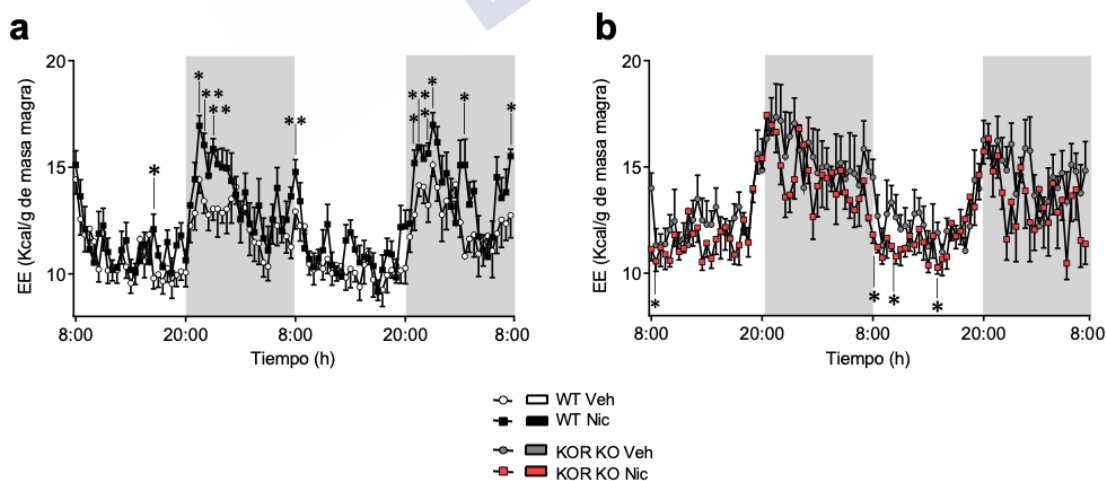


Figura 12. Efecto de la nicotina sobre el gasto energético en ratones KOR KO. (a-b) Gasto energético, energy expenditure (EE) (WT vehículo n = 5, WT nicotina n = 6, KO vehículo n = 5, KO nicotina n = 5) de ratones WT o KOR KO tratados con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

En conjunto, todas estas evidencias indican que KOR es necesario para que la nicotina ejerza su acción sobre el balance energético. Estos efectos no se explican debido a anomalías en los receptores nicotínicos de los ratones KOR KO, ya que ninguno de los receptores nicotínicos analizados (β 2-nAChR, β 4-nAChR, α 3-nAChR, α 4-nAChR, α 7-nAChR) mostró cambios significativos (solo una tendencia a incrementarse en el β 2-nAChR) en sus niveles de proteína comparado con los ratones WT (Fig. 13 a). Además, analizamos la concentración de dopamina (DA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid), serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) y NE en el hipotálamo, estriado y córtex de ratones WT y KOR KO. Nuestros datos muestran valores similares para todos los parámetros analizados (Fig. 13 b), sugiriendo que los cambios observados después del tratamiento con nicotina no están relacionados con ningún tipo de defecto generalizado que pueda caracterizar a los ratones mutantes de KOR.

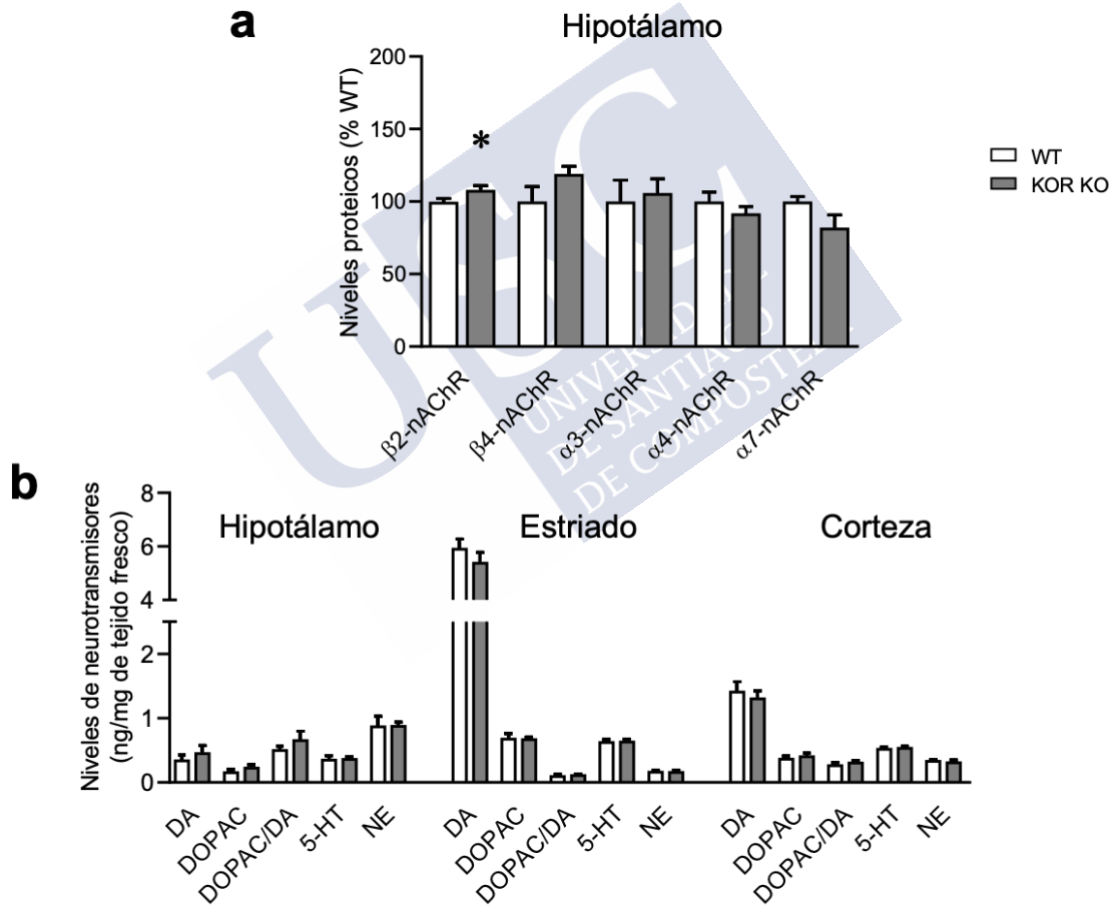


Figura 13. Caracterización molecular del modelo KOR KO. (a) Niveles proteicos de los receptores colinérgicos nicotínicos en el hipotálamo de ratones WT y KOR KO (WT n=7, KO n=7), (b) niveles de DA, DOPAC, 5-HT y NE en el hipotálamo, estriado y córtex de ratones WT y KOR KO (WT n=8, 8, 9, KO n=8, 8, 9). El ratio DOPAC/DA ha sido expresado en la misma gráfica, aunque no tiene unidades. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. WT.

Análisis más extensos demostraron que la nicotina induce la expresión de UCP1 y de otros marcadores termogénicos en el BAT de los ratones WT pero no de los KOR KO (Fig. 14 a-d). A continuación, se investigó si la acción de la nicotina sobre el *browning* en el WAT depende de KOR.

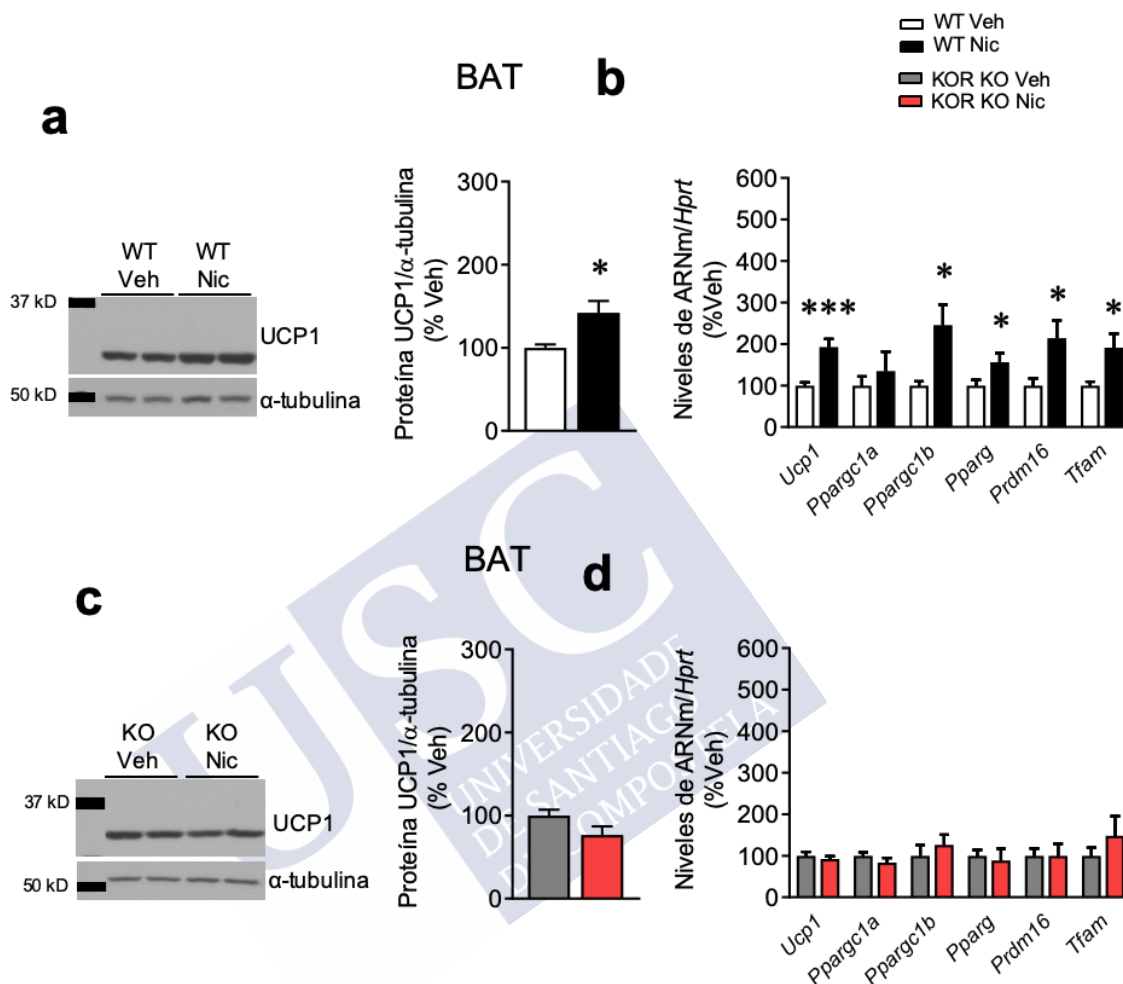


Figura 14. Efecto de la nicotina sobre el BAT en ratones KOR KO. (a-c) Imágenes representativas (paneles izquierdos) y niveles de proteína de UCP1 en el BAT (paneles derechos) (WT vehículo n = 11, WT nicotina n = 12, KO vehículo n = 8, KO nicotina n = 8), (b-d) niveles de ARNm de marcadores termogénicos en el BAT (WT vehículo n = 8, 8, 8, 8, 8, 7, WT nicotina n = 8, KO vehículo n = 8, KO nicotina n = 8, 8, 8, 7, 8, 7) de ratones WT (a, b) o KOR KO (c, d) tratados con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo. En el panel a y c que muestra las imágenes de los gels, todas las bandas de cada foto provienen del mismo gel pero han sido recortadas para expresarlo más claramente.

Las imágenes de IHC demostraron que la nicotina aumentó el área teñida de UCP1 en el gWAT, así como disminuyó el área de los adipocitos en los ratones WT, pero no en los animales KOR KO (Fig. 15 a-d). De acuerdo con estos datos, la nicotina incrementó la expresión de ARNm de marcadores de *browning*, como *Ucp1*, *Ppargc1a*, *Cidea* y *Prdm16* en el gWAT en los animales WT pero no en los KOR KO (Fig. 16 a,b). Todos estos resultados indican que la acción de la nicotina sobre el *browning* depende de KOR.

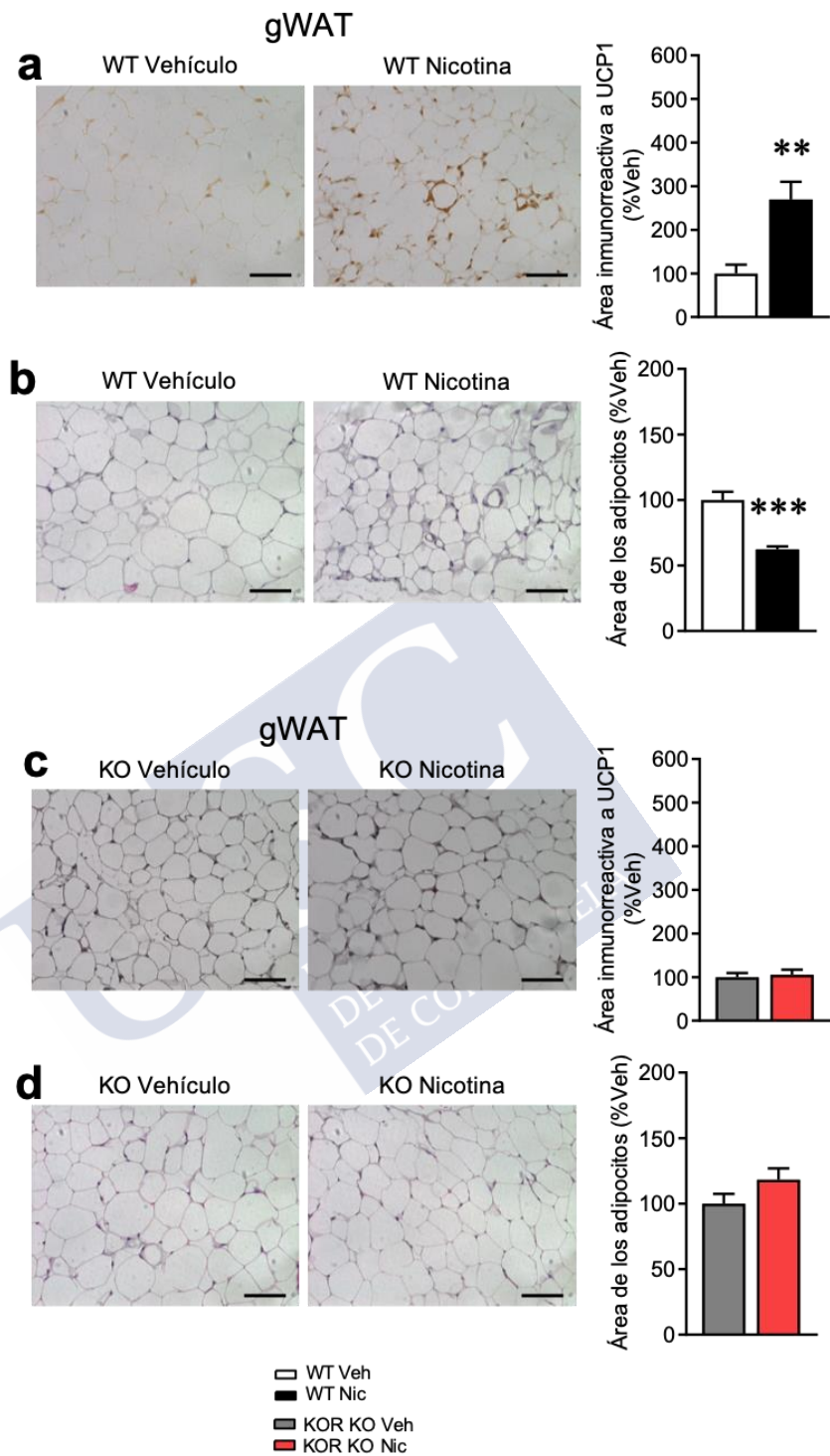


Figura 15. Efecto de la nicotina sobre el WAT en ratones KOR KO. (a, c) Inmunohistoquímica de UCP1 (paneles izquierdos 40×, barra de escala: 100 μm) y área inmunorreactiva a UCP1 (paneles derechos) en gWAT (WT vehículo n=10, WT nicotina n = 12, KO vehículo n = 14, KO nicotina n = 11), (b, d) tinción de hematoxilina-eosina (paneles izquierdos 40×, barra de escala: 100 μm) y área de los adipocitos (paneles derechos) en gWAT (WT vehículo n =10, WT nicotina n = 13, KO vehículo n = 14, KO nicotina n = 11) de ratones WT (a, b) o KOR KO (c, d) tratados con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

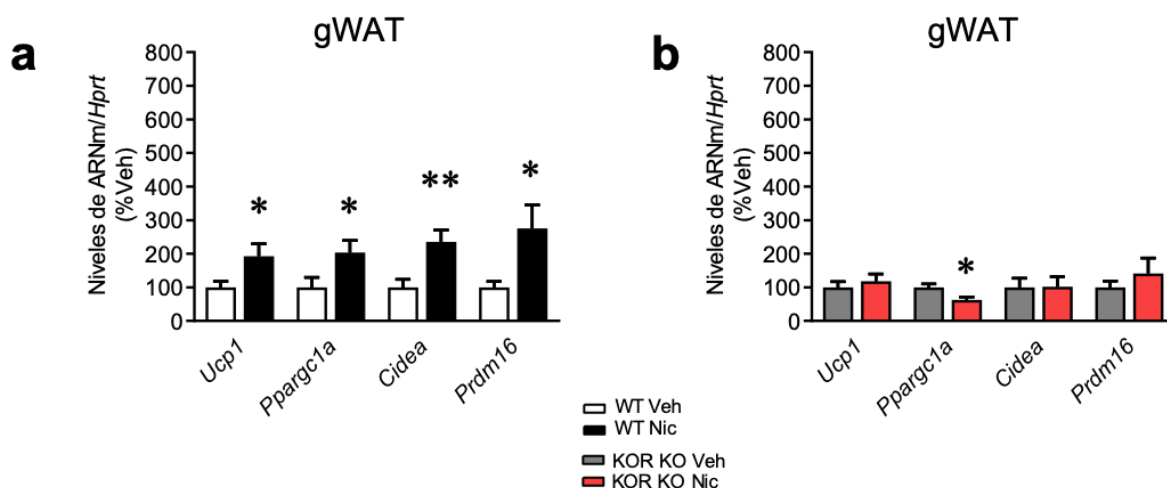


Figura 16. Efecto de la nicotina sobre los marcadores termogénicos en el WAT en ratones KOR KO. (a-b) Niveles de ARNm de marcadores termogénicos en gWAT (WT vehículo n = 7, 8, 7, 7, WT nicotina n = 7, 7, 6, 8, KO vehículo n = 6, 8, 7, 8, KO nicotina n = 8, 8, 8, 8) de ratones WT o KOR KO tratados con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

4. EL KOR EN EL LHA MEDIA LA ACCIÓN DE LA NICOTINA SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO

Como ya se había observado en estudios previos (Czyzyk et al., 2010), nuestros análisis de ARNm demostraron una expresión de KOR prácticamente inexistente en WAT y BAT de ratones y ratas, comparado con el hipotálamo (Fig. 17 a, b). Por lo tanto, a continuación, se evaluó el área hipotalámica específica dónde KOR media los efectos de la nicotina central.

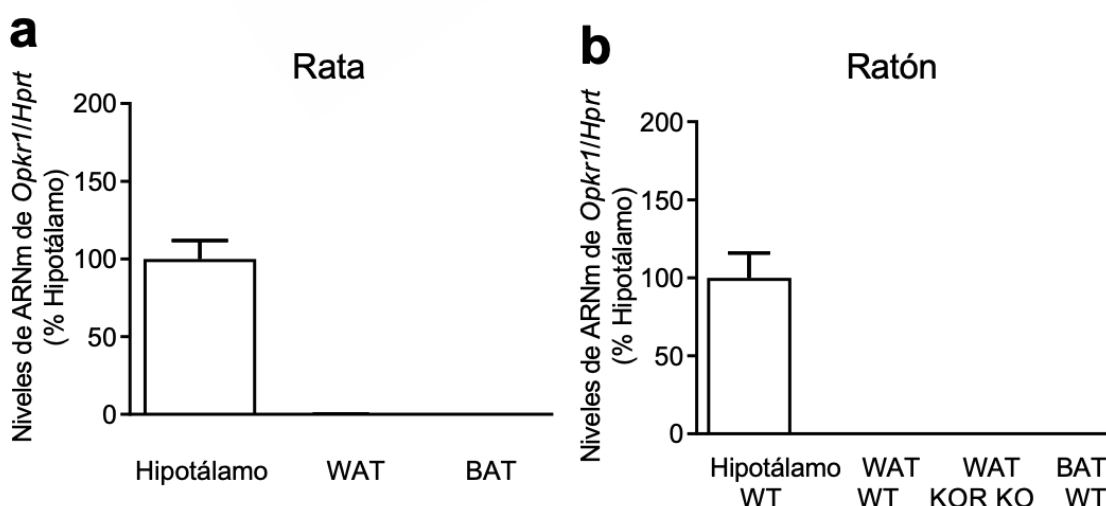


Figura 17. Niveles de *Opkr1* en los distintos tejidos en rata y ratón. (a-b) Niveles de ARNm de *Opkr1* en el hipotálamo, WAT y BAT de ratas (hipotálamo n=6, WAT n=8, BAT n=8) o ratones WT (hipotálamo n=7, WAT n=8, BAT n=7) y ratones KOR KO (WAT n=8). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. hipotálamo.

Se ha demostrado que KOR en el hipotálamo está involucrado en la modulación de la ingesta (Romero-Pico et al., 2013; Sainsbury et al., 2007), pero no existen evidencias que relacionen al KOR hipotalámico con las acciones de la nicotina. Para testar esto, se silenció selectivamente la expresión de KOR en ratas, usando AAVs que contienen un shRNA contra *Opkr1* (shRNA-*Opkr1*) (Romero-Pico et al., 2013) en áreas del hipotálamo que sabemos que modulan la actividad del SNS y/o el *browning*, como son el VMH y el LHA (Contreras et al., 2015; Lopez, Nogueiras, Tena-Sempere, & Dieguez, 2016; Martins et al., 2016; S. F. Morrison, Madden, & Tupone, 2014). La eficiencia del *knockdown* se validó mediante el descenso de la expresión de ARNm de *Opkr1* y/o el contenido proteico de KOR (pero no MOR ni DOR) en el VMH y en el LHA (Fig. 18 a-d).

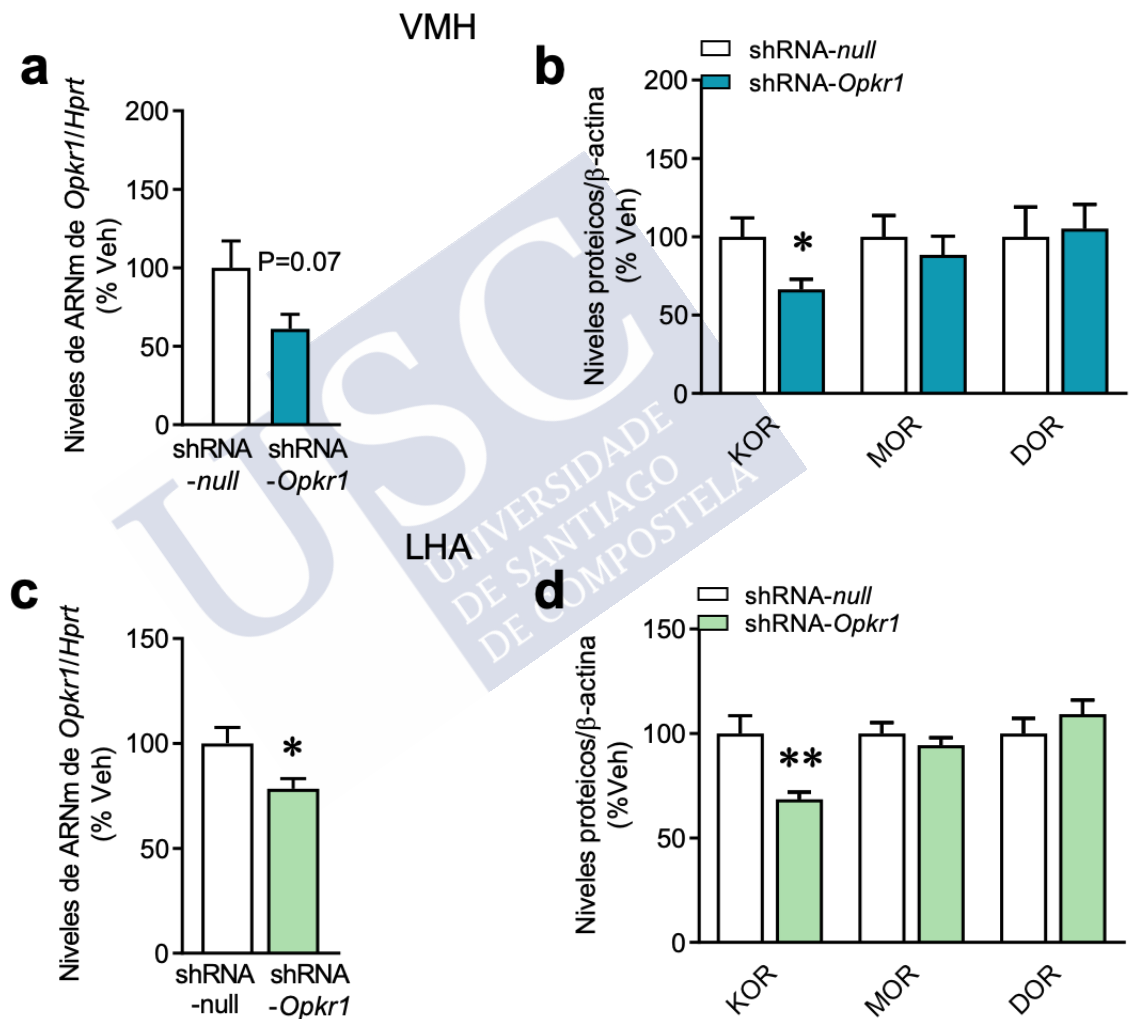


Figura 18. Silenciamiento selectivo de *Opkr1* en ratas en distintos núcleos hipotalámicos. (a) Niveles de ARNm de *Opkr1* en el VMH (shRNA-null n=6, shRNA-*Opkr1* n=6), (b) niveles proteicos de KOR, MOR y DOR en el VMH (shRNA-null n=6, 7, 7, shRNA-*Opkr1* n=7, 7, 7) de ratas tratadas con AAVs albergando un shRNA-null o un shRNA contra *Opkr1* en el VMH. (c) Niveles de ARNm de *Opkr1* en el LHA (shRNA-null n=7, shRNA-*Opkr1* n=8), (d) niveles proteicos de KOR, MOR y DOR en el LHA (shRNA-null n=8, 7, 7, shRNA-*Opkr1* n=8, 6, 6) de ratas tratadas con AAVs albergando un shRNA-null o un shRNA contra *Opkr1* en el LHA. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. shRNA-null.

El *knockdown* de KOR en el VMH no tuvo ningún impacto sobre el efecto de la nicotina en el balance energético en ratas (Fig. 19 a, b).

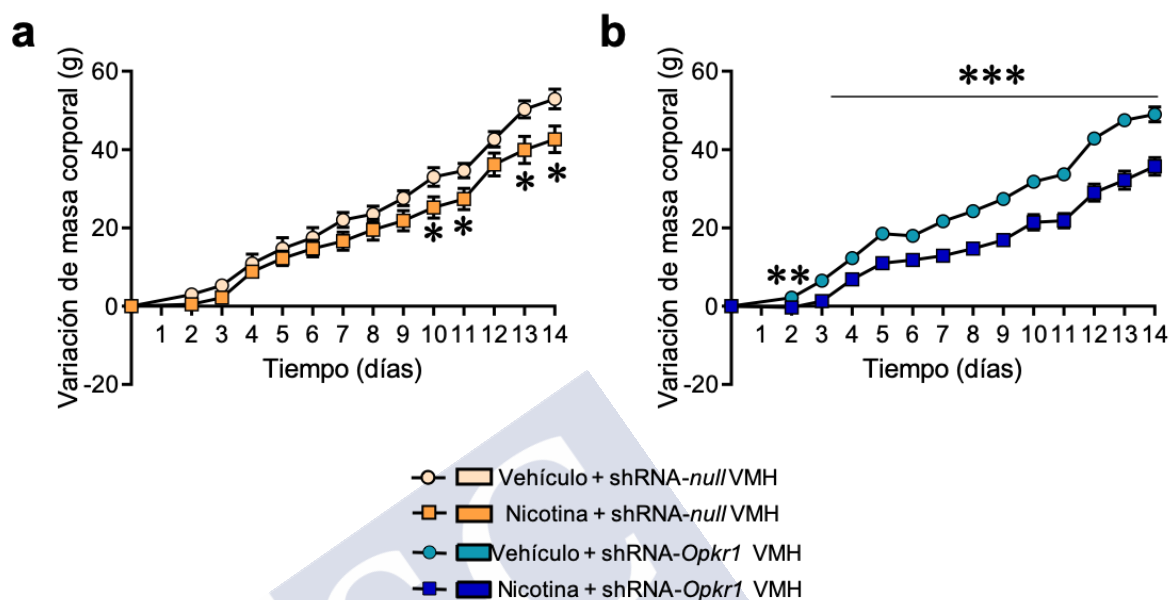


Figura 19. Efecto del knockdown de *Opkr1* en el VMH sobre el balance energético en ratas. (a-b) Variación de masa corporal (vehículo + shRNA-null n=10, nicotina + shRNA-null n=10, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=10, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=9) de ratas tratadas estereotáxicamente en el VMH con AAVs que contienen un shRNA-null o un shRNA contra *Opkr1* y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

En estudios previos se había demostrado que la acción de la nicotina sobre el BAT está mediada a través de AMPK en el VMH (Martinez de Morentin et al., 2012). Sin embargo, nuestros datos muestran que el efecto inhibitorio de la nicotina sobre AMPK en el VMH no está afectada por el *knockdown* selectivo de *Opkr1* en este núcleo (Fig. 20 a, b), sugiriendo que una interacción KOR-AMPK a este nivel no esté probablemente involucrada en el efecto central de la nicotina en los depósitos grasos.

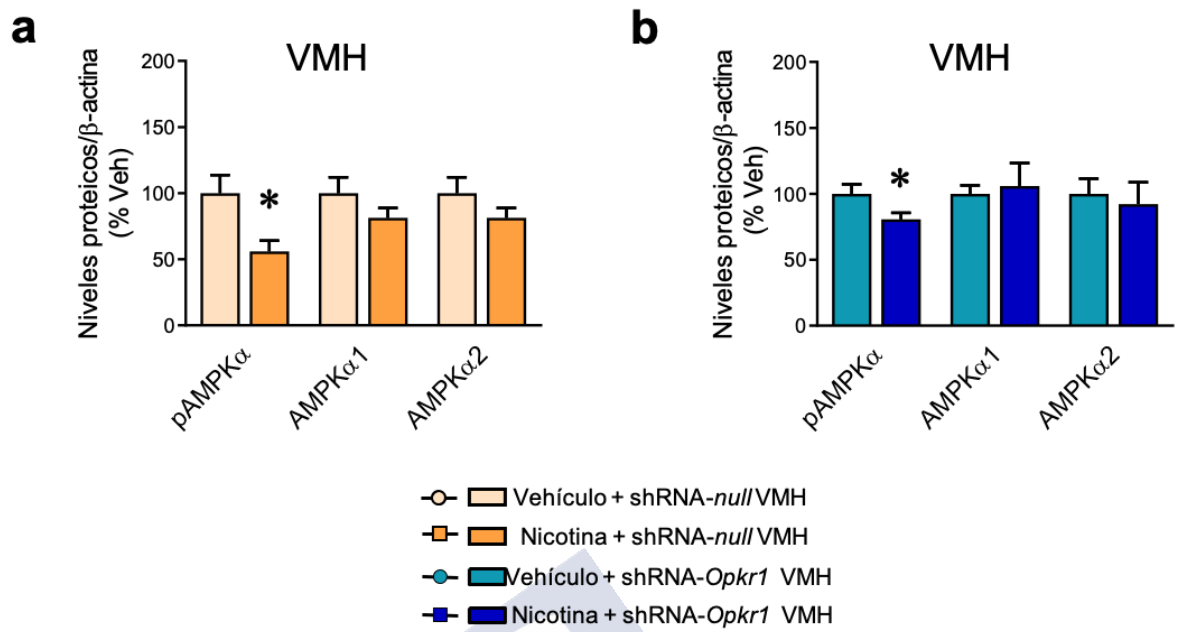


Figura 20. Efecto del *knockdown* de *Opkr1* en el VMH sobre el efecto de la nicotina en AMPK. (a-b) Niveles proteicos de AMPK en el VMH (vehículo + shRNA-null n=7, nicotina + shRNA-null n=7, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=7, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=7, 7, 6) de ratas estereotáxicamente tratadas en el VMH con AAVs que contienen un shRNA-null o un shRNA contra *Opkr1* y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

En consonancia con estos resultados, los análisis moleculares del BAT y del WAT también demostraron que la ablación genética parcial de KOR en el VMH tampoco tuvo impacto en la capacidad de la nicotina de inducir termogénesis en el BAT (Fig. 21 a-d) ni en el *browning* del WAT (Fig. 22 a-f).

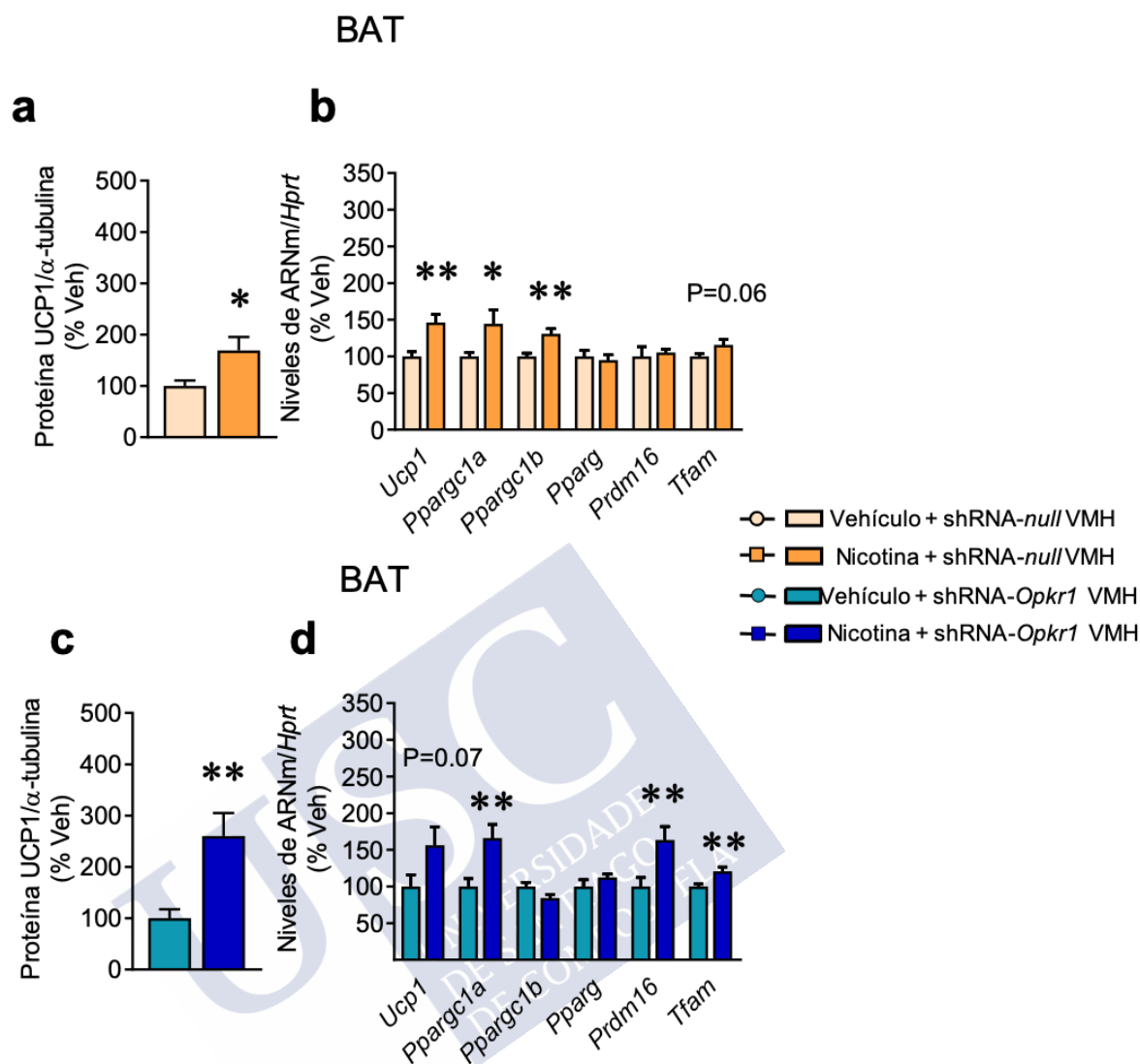


Figura 21. Efecto del knockdown de *Opkr1* en el VMH sobre el efecto de la nicotina en la termogénesis del BAT en ratas. (a,c) Niveles proteicos de UCP1 en el BAT (vehículo + shRNA-null n=7, nicotina + shRNA-null n=7, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=7, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=7), (b, d) niveles de ARNm de marcadores termogénicos en el BAT (vehículo + shRNA-null n=8, 8, 9, 10, 9, 9, nicotina + shRNA-null n=8, 8, 8, 8, 6, 8, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=9, 9, 7, 9, 9, 9, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=8, 7, 8, 7, 7, 8) de ratas estereotáxicamente tratadas en el VMH con AAVs que contienen un shRNA-null (a y b) o un shRNA contra *Opkr1* (c y d) y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media \pm SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. vehículo.

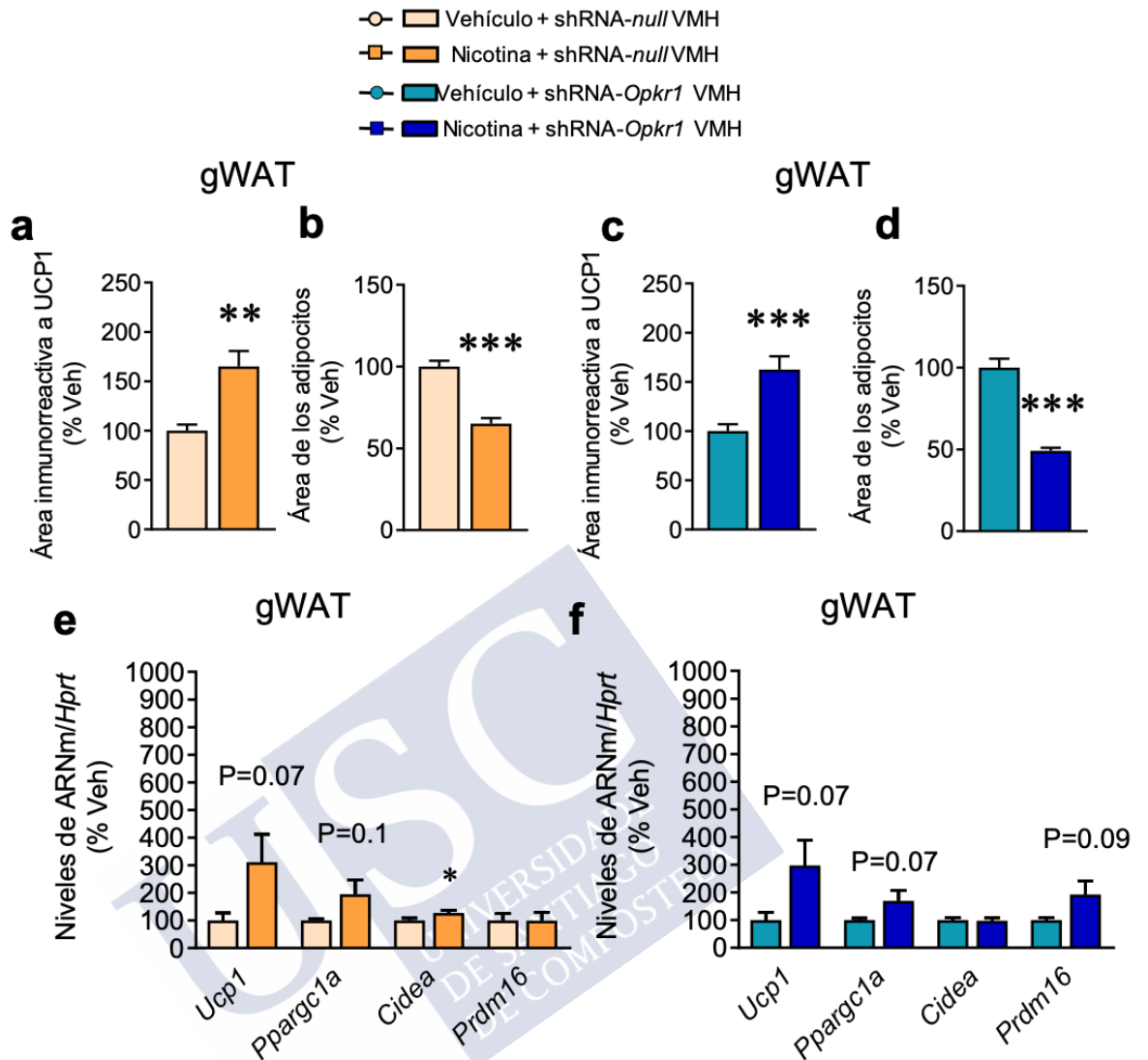


Figura 22. Efecto del *knockdown* de *Opkr1* en el VMH sobre el efecto de la nicotina en el *browning* en el WAT en ratas. (a, c) Área inmunorreactiva a UCP1 en el WAT (vehículo + shRNA-null n=9, nicotina + shRNA-null n=10, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=10, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=9), (b, d) área de los adipocitos en el WAT (vehículo + shRNA-null n=10, nicotina + shRNA-null n=10, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=10, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=9), (e-f) niveles de ARNm de marcadores termogénicos en el WAT (vehículo + shRNA-null n=8, 8, 10, 9, nicotina + shRNA-null n=9, 9, 10, 10, vehículo + shRNA-*Opkr1* n=8, 9, 10, 8, nicotina + shRNA-*Opkr1* n=9, 8, 9, 9) de ratas estereotáxicamente tratadas en el VMH con AAVs que contienen un shRNA-null (a, b y e) o un shRNA contra *Opkr1* (c, d y f) y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

En contraste al VMH, cuando se administran en el LHA los AAVs shRNA-*Opkr1*, desaparece totalmente el efecto de la nicotina sobre la masa corporal (Fig. 23 a, b), la termogénesis del BAT (Fig. 24 a-d) y el *browning* del gWAT, como demuestra la inmunohistoquímica de UCP1 (Fig. 25 a, c), un área de adipocitos inalterada (Fig. 24 b, d) y la expresión de marcadores termogénicos (Fig. 24 e, f), comparado con los controles. Todos estos resultados en conjunto indican que KOR en el LHA, pero no en el VMH, es requerido para las acciones de la nicotina central sobre el balance energético, la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT.

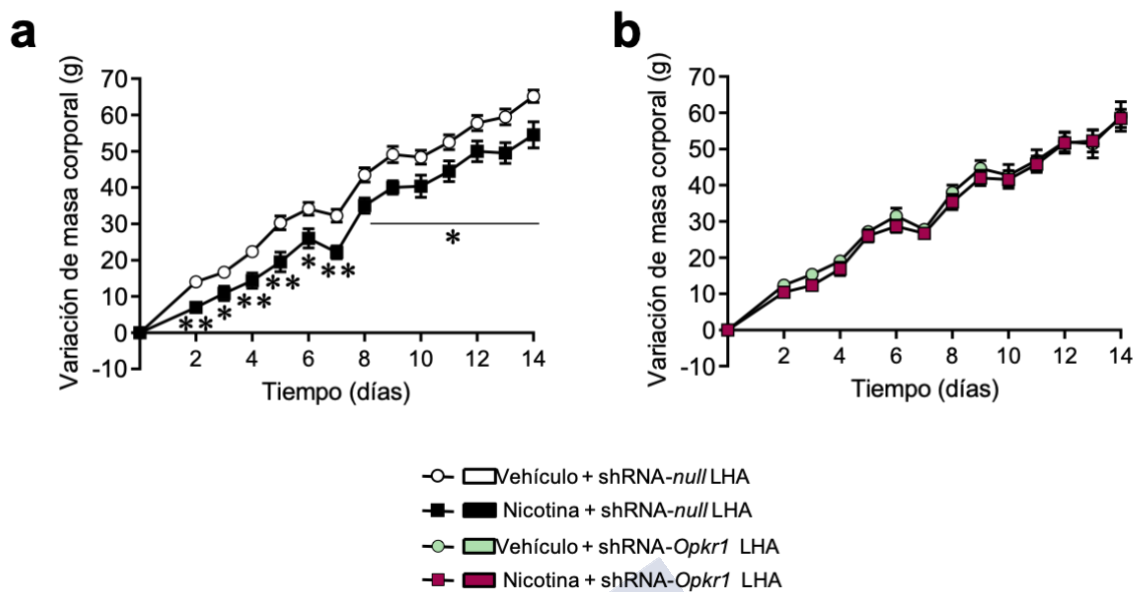


Figura 23. Efecto del knockdown de *Opkr1* en el LHA sobre el balance energético en ratas. (a-b) Variación de masa corporal (vehículo + shRNA-null LHA n = 8, nicotina+ shRNA-null LHA n = 6, vehículo+ shRNA-*Opkr1* LHA n =8, nicotina+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 9) de ratas tratadas estereotáxicamente en el LHA con AAVs que contienen un shRNA-null o un shRNA contra *Opkr1* y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

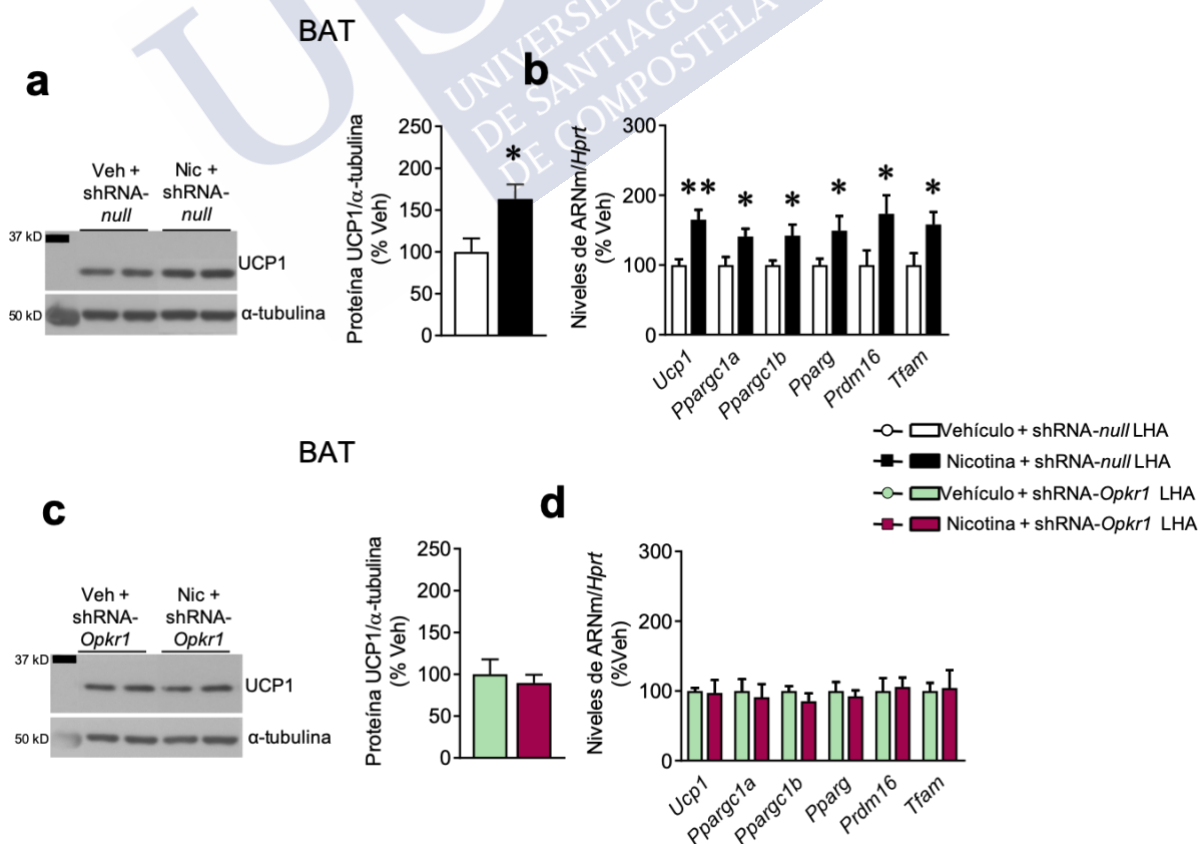
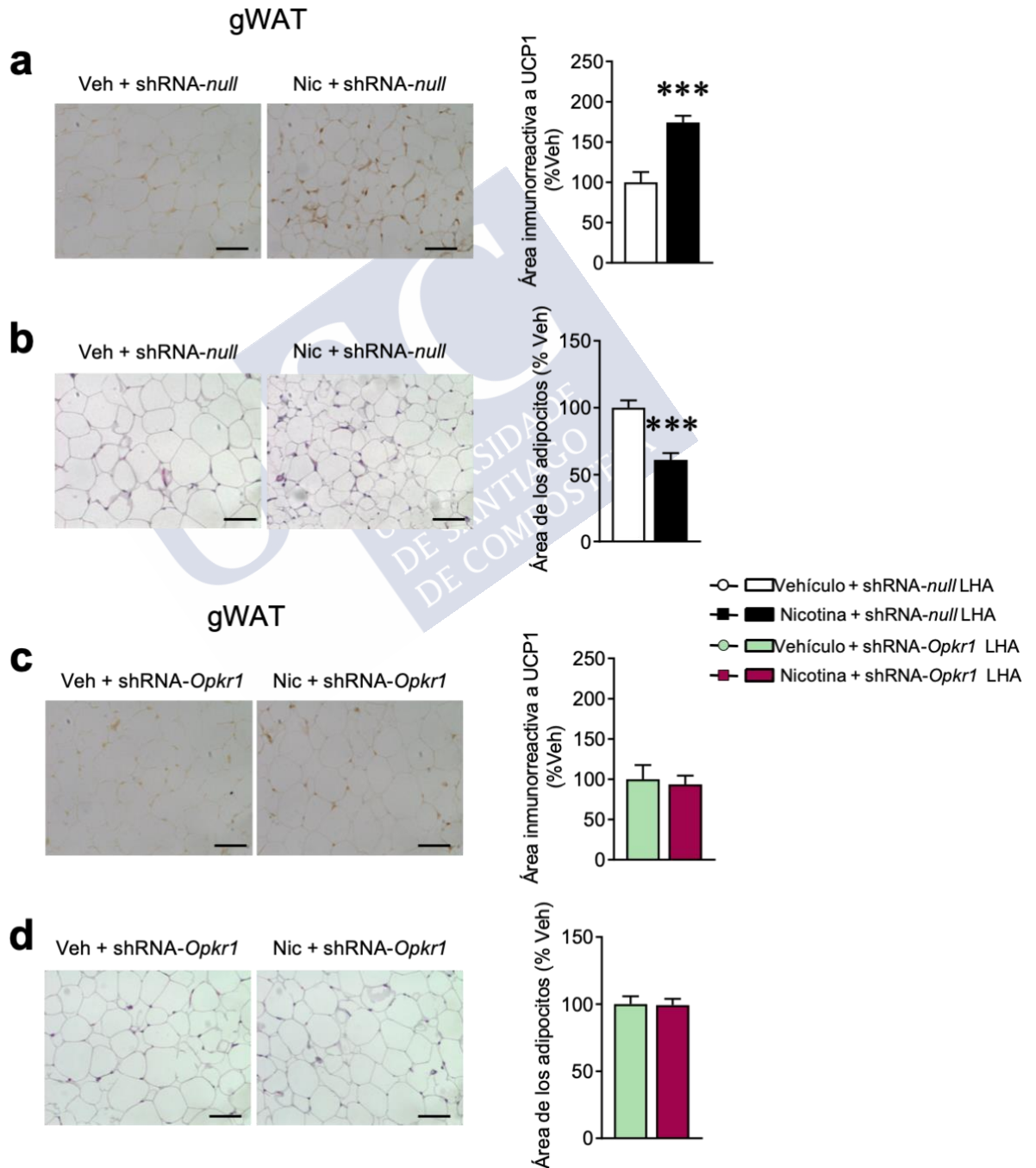


Figura 24. Efecto del *knockdown* de *Opkr1* en el LHA sobre la termogénesis en el BAT en ratas. (a, c) Imágenes representativas (paneles izquierdos) y niveles de proteína de UCP1 en el BAT (paneles derechos) (vehículo + shRNA-null LHA n = 7, nicotina+ shRNA-null LHA n = 6, vehículo+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 7, nicotina+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 7), (b, d) niveles de ARNm de marcadores termogénicos en el BAT (vehículo + shRNA-null LHA n = 8, nicotina+ shRNA-null LHA n = 6, vehículo+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 7, 8, 8, 8, 8, 8, nicotina+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 9, 9, 9, 9, 9, 7) de ratas tratadas estereotáxicamente en el LHA con AAVs que contienen un shRNA-null (a, b) o un shRNA contra *Opkr1* (c, d) y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo. En los paneles a y c que muestran las imágenes de los geles, todas las bandas de cada foto provienen del mismo gel pero han sido recortadas para expresarlo más claramente.



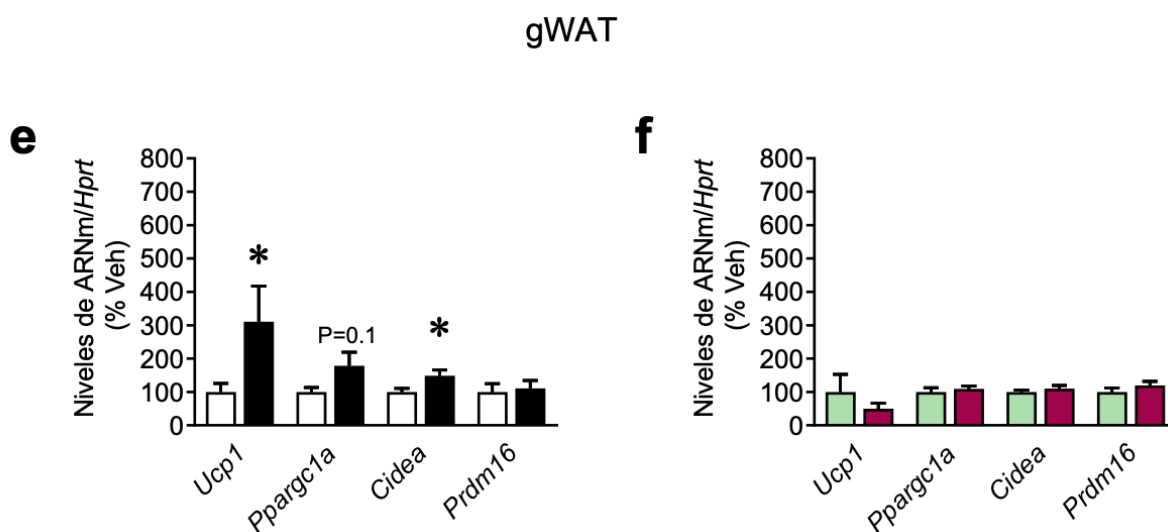


Figura 25. Efecto del *knockdown* de *Opkr1* en el LHA sobre el *browning* en el WAT en ratas. (a, c) Inmunohistoquímica de UCP1 (paneles izquierdos 20 × , barra de escala: 100 μm) y área inmunorreactiva a UCP1 (paneles derechos) en gWAT (vehículo + shRNA-null LHA n = 8, nicotina+ shRNA-null LHA n = 6, vehículo+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 8, nicotina+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 8), (b, d) tinción de hematoxilina-eosina (paneles izquierdos 20×, barra de escala: 100 μm) y área de los adipocitos (paneles derechos) en gWAT (vehículo +shRNA-null LHA n = 8, nicotina+ shRNA-null LHA n = 6, vehículo+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 8, nicotina +shRNA-*Opkr1* LHA, n = 9), (e, f) niveles de ARNm de marcadores termogénicos en gWAT (vehículo+ shRNA-null LHA n = 7, 6, 8, 7, nicotina+ shRNA-null LHA n= 5, 6, 6, 6, vehículo+ shRNA-*Opkr1* LHA n = 6, 7, 7, 7, nicotina+ shRNA-*Opkr1* LHA n =8, 8, 9, 8) de ratas tratadas estereotáxicamente en el LHA con AAVs que contienen un shRNA-null (a, b y e) o un shRNA contra *Opkr1* (c, d y f) y tratadas con vehículo o nicotina. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs. vehículo.

5. UCP1 EN EL WAT CORRELACIONA POSITIVAMENTE CON EL CONSUMO DE NICOTINA EN HUMANOS

Dada la relevancia de los datos obtenidos en modelos experimentales decidimos analizar su valor traslacional llevando a cabo un estudio en humanos. Para ello analizamos la relación existente entre la exposición a nicotina por fumar y la expresión de ARNm de UCP1 en el WAT en humanos (cohortes 1 y 2; Tablas 1 y 2 Materiales y métodos: Muestras humanas). En la cohorte 1, los datos mostraron que los niveles de ARNm de UCP1 en sWAT estaban incrementados en fumadores comparado con los controles (Fig. 26 a), a pesar de que ambos grupos son de edad e IMC similar (Fig. 26 b, c; Tabla 1 Materiales y métodos: Muestras humanas).

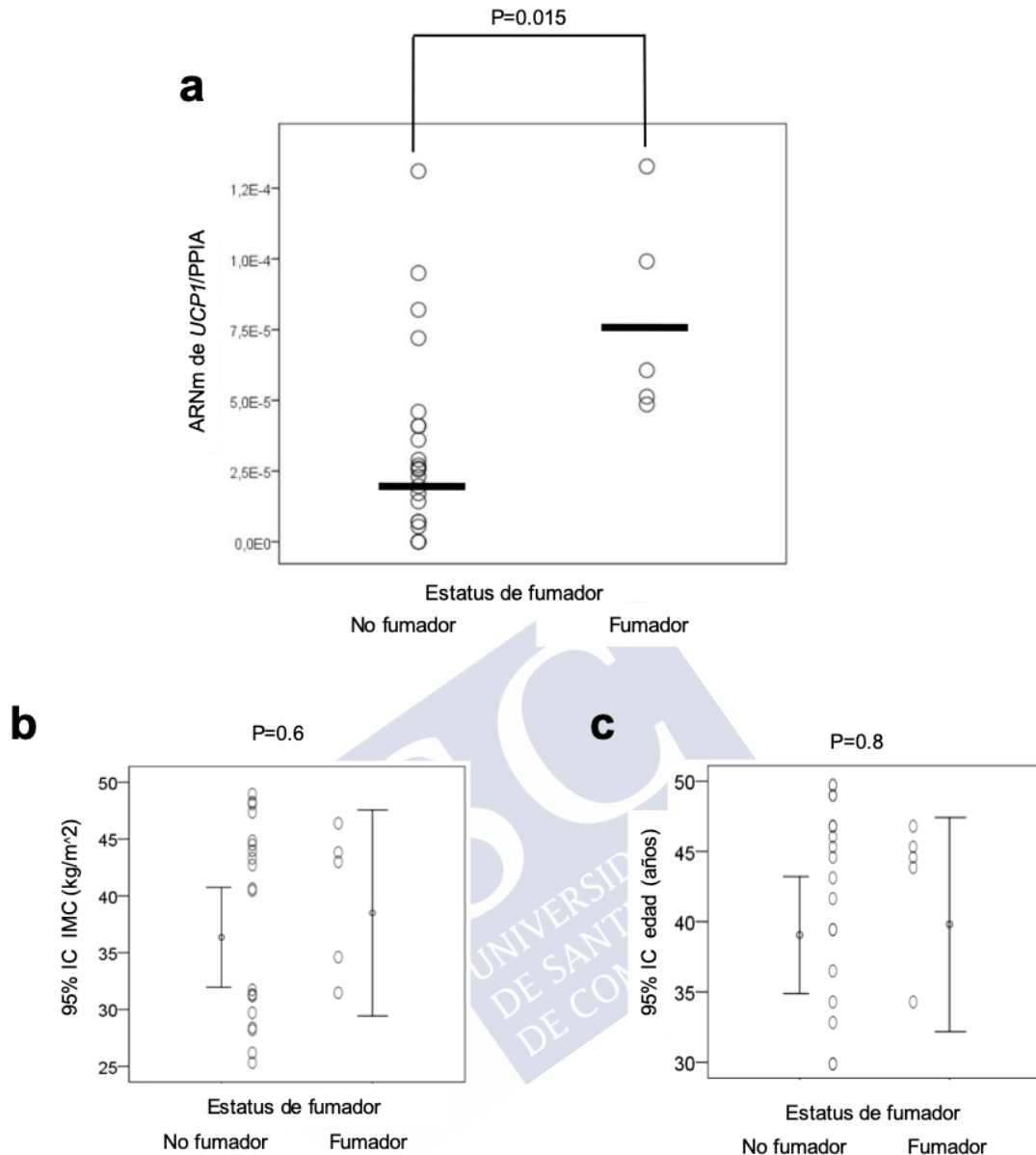


Figura 26. Efecto del estatus de fumador sobre el *browning* del WAT en humanos. (a-c) Niveles de ARNm de UCP1 en sWAT, IMC y edad en no fumadores o fumadores de la cohorte 1 (No fumador n= 20, Fumador n = 5). El análisis estadístico se realizó con ANOVA de un factor y con el test *post-hoc* de Bonferroni. Los valores centrales (líneas negras) representan la media.

La expresión de UCP1 correlaciona con el estatus de fumador, determinado por el número de cigarrillos por día (Fig. 27 a). Sin embargo, se sabe que el estatus de fumador no es siempre fidedigno cuando se basa en un mero cuestionario. En una serie independiente de 56 sujetos (cohorte 2; Tabla 2 Materiales y métodos: Muestras humanas), se confirmó esta asociación midiendo los niveles de cotinina circulante, un alcaloide encontrado en el tabaco que es el principal metabolito de la nicotina y que se usa como biomarcador para la exposición al humo del tabaco (Benowitz et al., 2009; Hukkanen et al., 2005). La cotinina en suero contribuyó significativamente a un 8% de la varianza de la expresión génica de UCP1 en el vWAT ajustada por la edad y el IMC (Fig. 27 b y Tabla 18). Estos datos sugieren que la nicotina también induce *browning* en humanos.

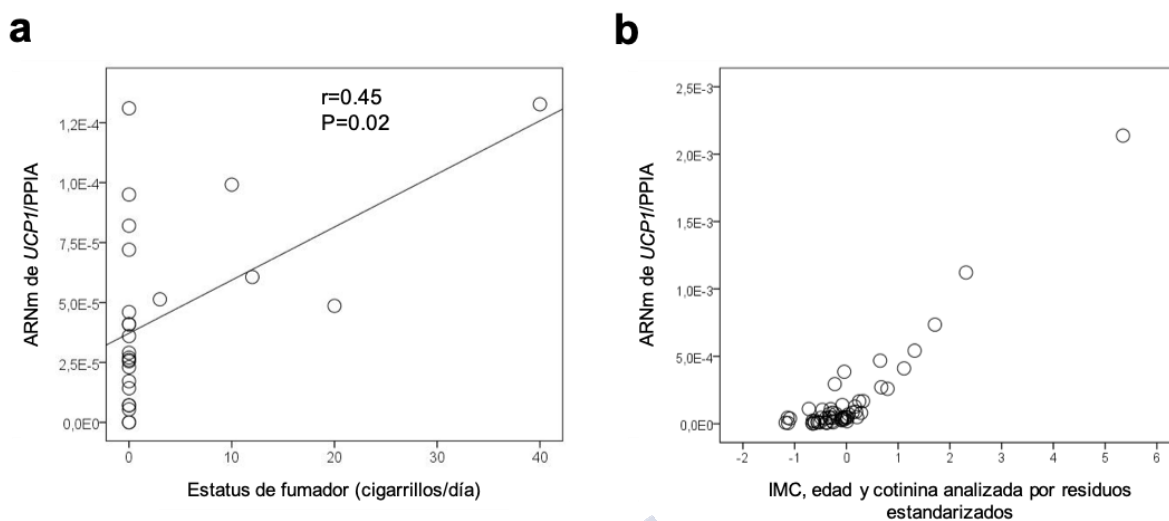


Figura 27. Efecto del estatus de fumador sobre el *browning* del WAT en humanos. (a) Correlación bivariante entre niveles de ARNm de UCP1 en sWAT y cigarrillos por día en fumadores de la cohorte 1 (n=25). Esta correlación fue similar usando correlaciones paramétricas (Pearson, $r = 0.46$, $P = 0.02$) o no paramétricas (Spearman, $r = 0.45$, $P = 0.02$) y (b) relación entre el IMC, la edad y la cotinina, analizada por residuos estandarizados, del modelo de regresión lineal múltiple y la expresión génica de UCP1 en vWAT (n=56).

Tabla 18. Análisis de regresión multivariante para predecir la expresión génica de UCP1 en vWAT en los participantes de la cohorte 2 (N= 56).

vWAT UCP1 (RU)*	Model 1		Model 2		Model 3	
	β	P	β	P	β	P
Edad (años)	0.9	0.5	-	-	0.06	0.6
IMC (kg/m ²)	-	-	0.21	0.1	0.19	0.1
Cotinina en suero (ng/ml)	0.28	0.03	0.28	0.03	0.27	0.04
R ₂ ajustada	0.058 (5.8%)		0.093 (9.3%)		0.079 (7.9%)	
P (modelo)	0.07		0.02		0.06	



DISCUSIÓN





Los datos recopilados en los últimos años han demostrado que, además de la activación del BAT, el *browning* del tejido adiposo juega un papel protector contra la obesidad inducida por la dieta (Carobbio, Guenantin, & Vidal-Puig, 2018; Contreras et al., 2015; Nedergaard & Cannon, 2014). Debido a esto, un incremento del gasto de energía mediante la activación de los mecanismos termogénicos en el BAT y el *browning* del WAT podrían ser considerados como una terapia efectiva contra la obesidad (Carobbio et al., 2018; Contreras et al., 2015; Nedergaard & Cannon, 2014). Por esta razón existe un gran interés en descubrir los mecanismos moleculares subyacentes a la activación de la termogénesis.

Las evidencias disponibles indican que el *browning* está regulado por factores muy variados. El frío es uno de ellos ya que el POA, que recibe información periférica sobre la temperatura externa, conecta de forma directa con el VMH para activar la termogénesis del BAT y con el DMH, a través de receptores de melanocortinas, para inducir *browning* en el WAT (Hogan et al., 1982; Monge-Roffarello et al., 2014; Preston et al., 1989). Otras son las señales endocrinas como las hormonas tiroideas, el estradiol, o los análogos de GLP1, que actúan mediante un mecanismo basado en la inhibición de AMPK en el VMH, activándose a continuación el SNS e incrementando la termogénesis y el *browning* (Alvarez-Crespo et al., 2016; Beiroa et al., 2014; Gonzalez-Garcia et al., 2017; Lopez-Valpuesta et al., 1996; Martinez de Morentin et al., 2014; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017). Además del frío y de las distintas señales endocrinas, otros componentes que modulan el *browning* son los factores de crecimiento, el microambiente tisular local o la inervación simpática (Carobbio et al., 2018; Contreras et al., 2015; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Nedergaard & Cannon, 2014). La influencia de estos factores es muy variable entre los diferentes depósitos grasos. A pesar de ello existen unas características comunes, específicas del fenotipo metabólico de este proceso de *browning*, como son el aumento de la expresión de la proteína UCP1 y la disminución del volumen de las células en ese tejido. Sería muy interesante descubrir los mecanismos subyacentes al *browning* y, de forma más específica, aquellos relacionados con la inervación simpática del WAT, ya que el grado de inervación de un tejido correlaciona directamente con una mayor presencia de *browning* y también con la cantidad de NE (Carobbio et al., 2018; Contreras et al., 2015; Nedergaard & Cannon, 2014).

Existen varios estudios que demuestran la implicación hipotalámica en los mecanismos moleculares que regulan los procesos termogénicos en el WAT y BAT. En este sentido, hay evidencias importantes que indican que el *browning* es un proceso que se induce a nivel central y que requiere de la activación del SNS (Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Martins et al., 2016; Nedergaard & Cannon, 2014). Distintas señales procedentes de la periferia activan de esta forma en el VMH la termogénesis y el *browning*, como BMP8B (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012), los lípidos complejos como las ceramidas, la nicotina (Seoane-Collazo et al., 2014), la leptina (Tanida et al., 2013), o las ya mencionadas HT (Alvarez-Crespo et al., 2016; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017), el estradiol (Gonzalez-Garcia et al., 2018; Gonzalez-Garcia et al., 2017; Martinez de Morentin et al., 2014) o los análogos de GLP1 (Beiroa et al., 2014).

La nicotina actúa sobre el balance energético modulando la ingesta y el gasto energético (Calarco & Picciotto, 2019; Martinez de Morentin et al., 2012; Mineur et al., 2011; Nogueiras, Dieguez, & Lopez, 2015; Seoane-Collazo et al., 2014; Tweed, Hsia, Lutfy, &

Friedman, 2012). Estudios clásicos muestran que inyecciones diarias de nicotina durante 6 meses llevan a la inducción de UCP1 en el WAT de ratones (Yoshida et al., 1999). Por lo tanto, el cerebro es una importante diana de las acciones de la nicotina en términos de metabolismo energético, actuando sobre la ingesta y la termogénesis del BAT (Calarco & Picciotto, 2019; Martínez de Morentin et al., 2012; Mineur et al., 2011; Seoane-Collazo et al., 2014; Tweed et al., 2012). Además, en un estudio reciente se ha evaluado también el papel de la nicotina en modelos de obesidad, en concreto el de obesidad inducida por dieta en roedores. En él se muestra cómo la nicotina aumenta la termogénesis y reduce la ingesta, a la vez que disminuye los niveles de insulina y mejora el perfil lipídico en el suero de los animales, junto con una reducción de la esteatosis e inflamación en el hígado (Seoane-Collazo et al., 2014). En conjunto, la nicotina disminuye la masa corporal de las ratas y mejora los problemas metabólicos asociados a la obesidad. Esto también nos informa del potencial que presenta la nicotina como una estrategia terapéutica a desarrollar contra la obesidad y otras comorbilidades a ella asociadas (Seoane-Collazo et al., 2014).

En humanos, la nicotina se consume generalmente de forma inhalada (fumando) y en menor medida, masticada. Después de una inhalación, la nicotina llega muy rápidamente al cerebro, en aproximadamente menos de 8 segundos, y cuando se mastica en menos de 3-5 minutos (Benowitz et al., 2009; Hukkanen et al., 2005). He aquí la importancia de usar un sistema de administración central para imitar un paradigma experimental que sea relevante en el caso de los humanos.

Por ello, el presente trabajo trata de investigar si la nicotina podría tener un efecto sobre el SNC para controlar el *browning* del WAT. Nuestros datos mostraron que la administración de nicotina ICV, reduce la masa corporal de los animales e incrementa la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT, en igual medida que cuando se administra la nicotina de forma periférica. Así, la nicotina aumentó de manera muy marcada la expresión de UCP1 y/o la inmunorreactividad a UCP1 en todos los depósitos grasos (gonadal, visceral y subcutáneo), y además produjo cambios morfológicos que son indicativos de la presencia de *browning*, como es la disminución del área de los adipocitos. Estos datos sugieren que la nicotina induce un balance energético negativo debido a que genera una disminución de la ingesta en los animales y un aumento del gasto energético. Considerando todo esto, es probable que el incremento del gasto energético no sólo sea debido a la termogénesis del BAT (Martínez de Morentin et al., 2012; Seoane-Collazo et al., 2014), sino también a la termogénesis inducida por el *browning*, ya que UCP1 en las mitocondrias de los adipocitos beige del tejido adiposo blanco también son termogénicamente funcionales (Shabalina et al., 2013).

En relación con esto, el papel del SNS en el control de la expresión de UCP1 y en la generación de *browning* (Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Nedergaard & Cannon, 2014), indicaron la posibilidad de que la nicotina pueda activar los nervios simpáticos que inervan el WAT. Nuestros datos muestran que la nicotina central no sólo aumenta la actividad simpática de las fibras que inervan el tejido adiposo y la concentración de NE circulante, sino que también promueve cambios en la plasticidad de las fibras simpáticas, como muestra el incremento en la densidad dendrítica de origen simpático en el gWAT tras la administración central de nicotina. Esto es relevante porque demuestra que, además de alteraciones funcionales, la nicotina puede inducir acciones tróficas sobre la inervación simpática hacia los depósitos grasos. Muchas evidencias demuestran que la actividad de SNS está íntimamente

relacionada con la actividad termogénica, pero además de eso, este incremento en su activación se describe junto con cambios morfológicos de las fibras simpáticas, reforzando que la nicotina actúa a nivel hipotalámico favoreciendo la actividad simpática de las fibras que inervan el tejido adiposo.

Por otro lado, el SNS es el mediador de las respuestas neuronales y hormonales al estrés, ya que está muy relacionado con situaciones de emergencia o amenaza conocidas como respuesta “*fight or flight*”. La activación del SNS en el organismo provoca, en primer lugar, una acción directa sobre el sistema cardiovascular que genera un aumento en la fuerza y velocidad de contracción del corazón (Brodal, 2004; Jänig, 2006). También existe una activación indirecta mediante la secreción de catecolaminas producidas por la médula adrenal estimulada por las fibras simpáticas. La activación del SNS también produce vasoconstricción en aquellos órganos que no son esenciales para la supervivencia en una situación de amenaza, como el tracto digestivo, los riñones y también la piel. Por el contrario, el flujo sanguíneo se incrementa en otros órganos como el músculo esquelético y los pulmones, esenciales para generar una respuesta rápida ante un peligro (Brodal, 2004; Jänig, 2006). Una activación inespecífica por la acción de la nicotina sobre este sistema, a largo plazo, podría tener efectos negativos en todo el organismo, a pesar de los efectos beneficiosos que pueda tener el *browning* del WAT sobre la masa corporal. Para poder considerar la nicotina como una alternativa terapéutica factible contra la obesidad, se requiere evitar los efectos secundarios, y por lo tanto buscar de manera selectiva sólo el aumento del tono del SNS de forma local en los depósitos grasos del organismo. Esto puede tener un gran potencial terapéutico ya que se evitarían efectos secundarios indeseados como los que caracterizan a la activación global del sistema simpático (Muller, Clemmensen, Finan, DiMarchi, & Tschop, 2018).

La nicotina es una de las drogas de abuso más consumidas debido a su gran poder de adicción (Holbrook, 2016; Siqueira et al., 2017), lo que genera dependencia física y psicológica (Caponnetto et al., 2012; Jain et al., 2008; Miyasato, 2013). Esta droga induce la liberación de opioides endógenos que actúan sobre el sistema de recompensa, lo que media los efectos hedónicos que refuerzan su consumo. El sistema opioide es uno de los reguladores principales de los procesos de recompensa que conducen a comportamientos adictivos en el consumo de agonistas de los receptores opioides o de otras drogas, entre ellas la nicotina (De Biasi & Dani, 2011; Malenka, 2009).

Para obtener más información sobre las acciones de la nicotina sobre el balance energético y específicamente sobre el WAT, se investigó la potencial contribución del sistema opioide (Nogueiras et al., 2012). Así, los datos obtenidos demuestran que la ablación global de KOR, utilizando animales KO, eliminó totalmente el efecto de la nicotina sobre la homeostasis energética y el *browning* del WAT. Estos descubrimientos nos llevaron a preguntarnos en qué tejidos la acción de KOR fue más relevante.

Dada la evidencia de que el *browning* puede ser generado por la acción directa de la nicotina sobre los receptores en el WAT, analizamos la expresión de KOR en el tejido adiposo. Sin embargo, encontramos que no existe expresión de KOR en el WAT, indicando que el efecto de KOR sobre el *browning* no ocurre a este nivel. KOR está ampliamente expresado en el SNC, particularmente en el hipotálamo, en áreas como el LHA, el VMH, el núcleo periventricular, el núcleo supraóptico, el DMH y el ARC, donde está involucrado en el control del metabolismo (Czyzyk et al., 2010; DePaoli, Hurley, Yasada, Reisine, & Bell,

1994; Nogueiras et al., 2012; Romero-Pico et al., 2013). Fuera del hipotálamo también podemos encontrar KOR en zonas como la sustancia negra y el VTA, entre otras (DePaoli et al., 1994). Dado que dentro del hipotálamo existen varios núcleos, como el VMH y el LHA, que están implicados en el control del *browning* (Contreras et al., 2015; Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Martins et al., 2016; S. F. Morrison et al., 2014; Nedergaard & Cannon, 2014), decidimos silenciar selectivamente *Opkr1* en sendos núcleos. Nuestro primer candidato fue el VMH, basado en datos previos del grupo en los que la nicotina modularía la termogénesis actuando de forma directa sobre este núcleo (a través de un mecanismo dependiente de AMPK/SNS) (Contreras, Gonzalez-Garcia, et al., 2017; Lopez et al., 2010; Martinez de Morentin et al., 2014; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017; Martinez-Sanchez, Seoane-Collazo, et al., 2017; Martins et al., 2016). Sorprendentemente, el silenciamiento parcial de KOR específicamente en el VMH no afectó ni a la acción catabólica de la nicotina ni a sus efectos en el BAT ni el WAT. Esto es importante ya que sugiere que AMPK en el VMH, un principal regulador del *browning* (Beiroa et al., 2014; Lopez et al., 2016; Martinez-Sanchez, Moreno-Navarrete, et al., 2017), no está involucrado en las acciones de la nicotina activando el *browning* en el WAT.

A continuación, se estudió si KOR en el LHA podía estar mediando los efectos de la nicotina. Datos recientes han mostrado que AMPK en el VMH controla la función del LHA para regular la homeostasis energética. La inhibición de AMPK en el VMH estimula el sistema de orexinas a través de un mecanismo glutamatérgico en el LHA, y esto promueve la termogénesis del BAT y el *browning* del WAT a través de la activación del SNS (Martins et al., 2016). Notablemente, cuando KOR fue eliminado en el LHA, los efectos de la nicotina sobre la masa corporal, la termogénesis en el BAT, y el *browning* del WAT fueron suprimidos; lo que fue confirmado mediante análisis de los niveles proteicos de UCP1 en BAT, de niveles de expresión de marcadores termogénicos en el BAT y el WAT, y de técnicas histológicas en los depósitos de grasa blanca. Estos datos sugieren que KOR en el LHA es crítico para el efecto catabólico central de la nicotina, así como sus acciones sobre el *browning* en el tejido adiposo blanco y en general sobre sus efectos sobre el balance energético.

Finalmente se evaluó la traslacionalidad de los datos obtenidos, procedentes de roedores, y se analizaron muestras de sWAT en humanos fumadores para comprobar la existencia de *browning*. Los resultados mostraron un incremento de UCP1 en el sWAT de individuos expuestos a la nicotina por fumar, y este aumento correlaciona con la cantidad de cigarrillos diarios que se consumen, determinado mediante el análisis de cotinina en suero, el metabolito principal de la nicotina. Todos estos datos indican que también se produce *browning* en el WAT de los humanos por la acción de la nicotina.

A un nivel fisiológico, es concebible que las neuronas colinérgicas tanto en el LHA (u otros núcleos hipotalámicos), como en la periferia pueden modular la actividad de los adipocitos blancos y, subsecuentemente regular así el proceso de *browning*. Sin embargo, la menor relevancia del mecanismo periférico asociado a la inducción de *browning* en humanos fumadores está, desde nuestro punto de vista, haciendo más plausible el efecto central de la nicotina. Esto está basado en el hecho de que el cerebro es la principal diana de la nicotina (Benowitz et al., 2009; Brody et al., 2006; Hukkanen et al., 2005). De hecho, mientras que los niveles circulantes periféricos de la nicotina son muy variables, sus niveles son más altos y con muchas menos fluctuaciones en el cerebro (Brody et al., 2006).

En resumen, nuestros resultados muestran que además de la posible acción directa sobre los receptores nicotínicos en el WAT, la nicotina modula el *browning* actuando a nivel central y regulando el tono simpático en la grasa blanca. Además, demostramos que una señalización intacta de KOR en el LHA es crítica para que la nicotina ejerza su acción catabólica y su inducción de *browning*. Por todo ello, esta evidencia sugiere que la dependencia funcional de la nicotina sobre KOR puede ofrecer nuevas posibilidades de tratamiento de la obesidad y sus enfermedades asociadas.

Es necesario explorar en más detalle hasta qué punto este nuevo mecanismo es un blanco susceptible de ser llevado a la clínica para el tratamiento de pacientes con obesidad. A favor de esta posibilidad está el hecho de que todos los datos de exposición crónica a nicotina se asocian a efectos beneficiosos sobre la homeostasis energética. El haber caracterizado un mecanismo, el receptor KOR, que media todos los efectos relevantes sobre la ingesta y gasto energético, permite actuar de forma más precisa, dado que dicho efecto solo se manifiesta cuando se actúa sobre el receptor KOR en el hipotálamo lateral, pero no en el núcleo ventromedial. Actuar de forma selectiva en subpoblaciones específicas de neuronas que expresan KOR en el hipotálamo lateral, era hasta recientemente una probabilidad más teórica que real. Sin embargo datos recientes utilizando exosomas han permitido hacerlo en el caso de neuronas del VMH. Sería muy deseable intentar un desarrollo similar con las neuronas KOR del hipotálamo lateral.





CONCLUSIONES





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

- La nicotina induce el *browning* actuando a nivel central y provocando la activación del tono simpático sobre la grasa blanca en modelos animales, lo cual explica en parte la pérdida de masa corporal asociada a su administración crónica.
- Todos los efectos analizados de la nicotina sobre el balance energético -ingesta y gasto energético, tanto por activación del tejido adiposo pardo como *browning*- son mediados por el receptor opioide tipo kappa en el hipotálamo lateral.
- En humanos fumadores crónicos, la exposición continuada a nicotina da lugar a un aumento del *browning* en los depósitos grasos estudiados.





BIBLIOGRAFÍA





(SEEDO), S. E. d. O. IMC. Retrieved from <https://www.seedo.es/index.php/pacientes/calculo-imc>

Albuquerque, E. X., Alkondon, M., Pereira, E. F., Castro, N. G., Schratzenholz, A., Barbosa, C. T., . . . Maelicke, A. (1997). Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther*, *280*(3), 1117-1136. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9067295>

Alkondon, M., Pereira, E. F., Cortes, W. S., Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (1997). Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci*, *9*(12), 2734-2742. doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb01702.x

Alvarez-Crespo, M., Csikasz, R. I., Martinez-Sanchez, N., Dieguez, C., Cannon, B., Nedergaard, J., & Lopez, M. (2016). Essential role of UCP1 modulating the central effects of thyroid hormones on energy balance. *Mol Metab*, *5*(4), 271-282. doi:10.1016/j.molmet.2016.01.008

Alvarez-Crespo, M., Martinez-Sanchez, N., Ruiz-Pino, F., Garcia-Lavandeira, M., Alvarez, C. V., Tena-Sempere, M., . . . Lopez, M. (2013). The orexigenic effect of orexin-A revisited: dependence of an intact growth hormone axis. *Endocrinology*, *154*(10), 3589-3598. doi:10.1210/en.2013-1251

Amir, S. (1990). Intra-ventromedial hypothalamic injection of glutamate stimulates brown adipose tissue thermogenesis in the rat. *Brain Res*, *511*(2), 341-344. doi:10.1016/0006-8993(90)90181-a

An, Z., Wang, H., Song, P., Zhang, M., Geng, X., & Zou, M. H. (2007). Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress. *J Biol Chem*, *282*(37), 26793-26801. doi:10.1074/jbc.M703701200

Anand, B. K., & Brobeck, J. R. (1951). Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*, *77*(2), 323-324. doi:10.3181/00379727-77-18766

Andersson, K., & Arner, P. (1995). Cholinergic-mediated effects on glycerol output from human adipose tissue using in situ microdialysis. *Br J Pharmacol*, *115*(7), 1155-1162. doi:10.1111/j.1476-5381.1995.tb15018.x

Andersson, K., & Arner, P. (2001). Systemic nicotine stimulates human adipose tissue lipolysis through local cholinergic and catecholaminergic receptors. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *25*(8), 1225-1232. doi:10.1038/sj.ijo.0801654

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

Arai, K., Kim, K., Kaneko, K., Iketani, M., Otagiri, A., Yamauchi, N., & Shibasaki, T. (2001). Nicotine infusion alters leptin and uncoupling protein 1 mRNA expression in adipose tissues of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *280*(6), E867-876. doi:10.1152/ajpendo.2001.280.6.E867

Arase, K., York, D. A., Shimizu, H., Shargill, N., & Bray, G. A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol*, *255*(3 Pt 1), E255-259. doi:10.1152/ajpendo.1988.255.3.E255

- Aravich, P. F., & Sclafani, A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci*, *97*(6), 970-983. doi:10.1037//0735-7044.97.6.970
- Armitage, A. K., Dollery, C. T., George, C. F., Houseman, T. H., Lewis, P. J., & Turner, D. M. (1975). Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J*, *4*(5992), 313-316. doi:10.1136/bmj.4.5992.313
- Ashakumary, L., & Vijayammal, P. L. (1997). Effect of nicotine on lipoprotein metabolism in rats. *Lipids*, *32*(3), 311-315. doi:10.1007/s11745-997-0038-8
- Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., & Sternson, S. M. (2012). Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*, *488*(7410), 172-177. doi:10.1038/nature11270
- Bai, F. L., Yamano, M., Shiotani, Y., Emson, P. C., Smith, A. D., Powell, J. F., & Tohyama, M. (1985). An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res*, *331*(1), 172-175. doi:10.1016/0006-8993(85)90730-9
- Bamshad, M., Aoki, V. T., Adkison, M. G., Warren, W. S., & Bartness, T. J. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol*, *275*(1), R291-299. doi:10.1152/ajpregu.1998.275.1.R291
- Bamshad, M., Song, C. K., & Bartness, T. J. (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol*, *276*(6), R1569-1578. doi:10.1152/ajpregu.1999.276.6.R1569
- Banting, F. G., Best, C. H., Collip, J. B., Campbell, W. R., & Fletcher, A. A. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J*, *12*(3), 141-146. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20314060>
- Bartelt, A., Bruns, O. T., Reimer, R., Hohenberg, H., Itrich, H., Peldschus, K., . . . Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*, *17*(2), 200-205. doi:10.1038/nm.2297
- Bartness, T. J., Liu, Y., Shrestha, Y. B., & Ryu, V. (2014). Neural innervation of white adipose tissue and the control of lipolysis. *Front Neuroendocrinol*, *35*(4), 473-493. doi:10.1016/j.yfrne.2014.04.001
- Bartness, T. J., Vaughan, C. H., & Song, C. K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*, *34* Suppl 1, S36-42. doi:10.1038/ijo.2010.182
- Batterham, R. L., Cowley, M. A., Small, C. J., Herzog, H., Cohen, M. A., Dakin, C. L., . . . Bloom, S. R. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, *418*(6898), 650-654. doi:10.1038/nature00887
- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., . . . Nogueiras, R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*, *63*(10), 3346-3358. doi:10.2337/db14-0302

- Bellinger, L. L., Wellman, P. J., Harris, R. B., Kelso, E. W., & Kramer, P. R. (2010). The effects of chronic nicotine on meal patterns, food intake, metabolism and body weight of male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, *95*(1), 92-99. doi:10.1016/j.pbb.2009.12.012
- Benowitz, N. L. (2009). Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *49*, 57-71. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094742
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P., 3rd. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*(192), 29-60. doi:10.1007/978-3-540-69248-5_2
- Benowitz, N. L., & Jacob, P., 3rd. (1984). Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther*, *35*(4), 499-504. doi:10.1038/clpt.1984.67
- Benowitz, N. L., & Jacob, P., 3rd. (1994). Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther*, *56*(5), 483-493. doi:10.1038/clpt.1994.169
- Benowitz, N. L., Jacob, P., 3rd, Fong, I., & Gupta, S. (1994). Nicotine metabolic profile in man: comparison of cigarette smoking and transdermal nicotine. *J Pharmacol Exp Ther*, *268*(1), 296-303. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8301571>
- Benowitz, N. L., Jacob, P., 3rd, Jones, R. T., & Rosenberg, J. (1982). Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J Pharmacol Exp Ther*, *221*(2), 368-372. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7077531>
- Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1987). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res*, *434*(3), 321-381. doi:10.1016/0165-0173(87)90004-x
- Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev*, *20*(2), 189-287. doi:10.1016/0149-7634(95)00015-1
- Berthoud, H. R., & Morrison, C. (2008). The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol*, *59*, 55-92. doi:10.1146/annurev.psych.59.103006.093551
- Bi, S., Kim, Y. J., & Zheng, F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides*, *46*(6), 309-314. doi:10.1016/j.npep.2012.09.002
- Bianco, A. C., Sheng, X. Y., & Silva, J. E. (1988). Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J Biol Chem*, *263*(34), 18168-18175. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3192531>
- Bingham, N. C., Anderson, K. K., Reuter, A. L., Stallings, N. R., & Parker, K. L. (2008). Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology*, *149*(5), 2138-2148. doi:10.1210/en.2007-1200
- Bittencourt, J. C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J. L., . . . Sawchenko, P. E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol*, *319*(2), 218-245. doi:10.1002/cne.903190204

- Blaha, V., Yang, Z. J., Meguid, M., Chai, J. K., & Zadak, Z. (1998). Systemic nicotine administration suppresses food intake via reduced meal sizes in both male and female rats. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, *41*(4), 167-173. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9951048>
- Bodnar, R. J. (2008). Endogenous opiates and behavior: 2007. *Peptides*, *29*(12), 2292-2375. doi:10.1016/j.peptides.2008.09.007
- Bodnar, R. J. (2009). Endogenous opiates and behavior: 2008. *Peptides*, *30*(12), 2432-2479. doi:10.1016/j.peptides.2009.09.027
- Boulant, J. A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis*, *31 Suppl 5*, S157-161. doi:10.1086/317521
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*, *24*(11), 2797-2805. doi:10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004
- Bray, G. A. (2000). Reciprocal relation of food intake and sympathetic activity: experimental observations and clinical implications. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *24 Suppl 2*, S8-17. doi:10.1038/sj.ijo.0801269
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J. G., & Hokfelt, T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol*, *402*(4), 460-474. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862321>
- Brodal, P. (2004). *The Central Nervous System: Structure and Function* (3 ed. ed.): Oxford University Press US.
- Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Olmstead, R. E., Farahi, J., Scheibal, D., . . . Mukhin, A. G. (2006). Cigarette smoking saturates brain alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *Arch Gen Psychiatry*, *63*(8), 907-915. doi:10.1001/archpsyc.63.8.907
- Brown, R. W., & Kolb, B. (2001). Nicotine sensitization increases dendritic length and spine density in the nucleus accumbens and cingulate cortex. *Brain Res*, *899*(1-2), 94-100. doi:10.1016/s0006-8993(01)02201-6
- Brunzell, D. H., Chang, J. R., Schneider, B., Olausson, P., Taylor, J. R., & Picciotto, M. R. (2006). beta2-Subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are involved in nicotine-induced increases in conditioned reinforcement but not progressive ratio responding for food in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*(3-4), 328-338. doi:10.1007/s00213-005-0099-z
- Byrd, G. D., Chang, K. M., Greene, J. M., & deBethizy, J. D. (1992). Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine, cotinine, and trans-3'-hydroxycotinine in smokers. *Drug Metab Dispos*, *20*(2), 192-197. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1352209>
- C, P. G. W. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (7th Ed. ed.): Academic Press.
- Calarco, C. A., & Picciotto, M. R. (2019). Nicotinic acetylcholine receptor signaling in the hypothalamus: mechanisms related to nicotine's effects on food intake. *Nicotine Tob Res*. doi:10.1093/ntr/ntz010

- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*, *84*(1), 277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
- Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). What Ignites UCP1? *Cell Metab*, *26*(5), 697-698. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.012
- Cano, G., Passerin, A. M., Schiltz, J. C., Card, J. P., Morrison, S. F., & Sved, A. F. (2003). Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol*, *460*(3), 303-326. doi:10.1002/cne.10643
- Cao, W., Medvedev, A. V., Daniel, K. W., & Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, *276*(29), 27077-27082. doi:10.1074/jbc.M101049200
- Cao, Y., Wang, H., Wang, Q., Han, X., & Zeng, W. (2018). Three-dimensional volume fluorescence-imaging of vascular plasticity in adipose tissues. *Mol Metab*, *14*, 71-81. doi:10.1016/j.molmet.2018.06.004
- Caponnetto, P., Campagna, D., Papale, G., Russo, C., & Polosa, R. (2012). The emerging phenomenon of electronic cigarettes. *Expert Rev Respir Med*, *6*(1), 63-74. doi:10.1586/ers.11.92
- Carobbio, S., Guenantin, A. C., & Vidal-Puig, A. (2018). 'Basic and Applied Thermogenesis Research' Bridging the Gap. *Trends Endocrinol Metab*, *29*(1), 5-7. doi:10.1016/j.tem.2017.10.002
- Cascio, M. (2004). Structure and function of the glycine receptor and related nicotinic receptors. *J Biol Chem*, *279*(19), 19383-19386. doi:10.1074/jbc.R300035200
- Chajek-Shaul, T., Scherer, G., Barash, V., Shiloni, E., Caine, Y., Stein, O., & Stein, Y. (1994). Metabolic effects of nicotine on human adipose tissue in organ culture. *Clin Investig*, *72*(2), 94-99. doi:10.1007/bf00184583
- Challis, B. G., Coll, A. P., Yeo, G. S., Pinnock, S. B., Dickson, S. L., Thresher, R. R., . . . O'Rahilly, S. (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(13), 4695-4700. doi:10.1073/pnas.0306931101
- Chao, P. T., Yang, L., Aja, S., Moran, T. H., & Bi, S. (2011). Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab*, *13*(5), 573-583. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.019
- Chen, A. S., Marsh, D. J., Trumbauer, M. E., Frazier, E. G., Guan, X. M., Yu, H., . . . Van der Ploeg, L. H. (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet*, *26*(1), 97-102. doi:10.1038/79254
- Chen, H., Hansen, M. J., Jones, J. E., Vlahos, R., Anderson, G. P., & Morris, M. J. (2008). Long-term cigarette smoke exposure increases uncoupling protein expression but reduces energy intake. *Brain Res*, *1228*, 81-88. doi:10.1016/j.brainres.2008.06.067
- Chen, H., Hansen, M. J., Jones, J. E., Vlahos, R., Bozinovski, S., Anderson, G. P., & Morris, M. J. (2006). Cigarette smoke exposure reprograms the hypothalamic neuropeptide Y axis to promote weight loss. *Am J Respir Crit Care Med*, *173*(11), 1248-1254. doi:10.1164/rccm.200506-9770C

- Chen, H., Hansen, M. J., Jones, J. E., Vlahos, R., Bozinovski, S., Anderson, G. P., & Morris, M. J. (2007). Regulation of hypothalamic NPY by diet and smoking. *Peptides*, *28*(2), 384-389. doi:10.1016/j.peptides.2006.07.034
- Chen, Y., Hu, C., Hsu, C. K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., . . . Shi, Y. (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology*, *143*(7), 2469-2477. doi:10.1210/endo.143.7.8903
- Chi, J., Wu, Z., Choi, C. H. J., Nguyen, L., Tegegne, S., Ackerman, S. E., . . . Cohen, P. (2018). Three-Dimensional Adipose Tissue Imaging Reveals Regional Variation in Beige Fat Biogenesis and PRDM16-Dependent Sympathetic Neurite Density. *Cell Metab*, *27*(1), 226-236 e223. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.011
- Choi, Y. H., Fujikawa, T., Lee, J., Reuter, A., & Kim, K. W. (2013). Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis. *Front Neurosci*, *7*, 71. doi:10.3389/fnins.2013.00071
- Chowdhury, P., Hosotani, R., Chang, L., & Rayford, P. L. (1990). Metabolic and pathologic effects of nicotine on gastrointestinal tract and pancreas of rats. *Pancreas*, *5*(2), 222-229. doi:10.1097/00006676-199003000-00016
- Chowdhury, P., Hosotani, R., & Rayford, P. L. (1989). Weight loss and altered circulating GI peptide levels of rats exposed chronically to nicotine. *Pharmacol Biochem Behav*, *33*(3), 591-594. doi:10.1016/0091-3057(89)90393-6
- Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., & Parker, M. G. (2005). RIP140-targeted repression of gene expression in adipocytes. *Mol Cell Biol*, *25*(21), 9383-9391. doi:10.1128/MCB.25.21.9383-9391.2005
- Christian, M., White, R., & Parker, M. G. (2006). Metabolic regulation by the nuclear receptor corepressor RIP140. *Trends Endocrinol Metab*, *17*(6), 243-250. doi:10.1016/j.tem.2006.06.008
- Clark, J. T., Kalra, P. S., Crowley, W. R., & Kalra, S. P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*, *115*(1), 427-429. doi:10.1210/endo-115-1-427
- Clemmensen, C., Muller, T. D., Woods, S. C., Berthoud, H. R., Seeley, R. J., & Tschop, M. H. (2017). Gut-Brain Cross-Talk in Metabolic Control. *Cell*, *168*(5), 758-774. doi:10.1016/j.cell.2017.01.025
- Clifford, G. M., Londos, C., Kraemer, F. B., Vernon, R. G., & Yeaman, S. J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem*, *275*(7), 5011-5015. doi:10.1074/jbc.275.7.5011
- Colquhoun, D., & Sivilotti, L. G. (2004). Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends Neurosci*, *27*(6), 337-344. doi:10.1016/j.tins.2004.04.010
- Cone, R. D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*, *8*(5), 571-578. doi:10.1038/nn1455
- Contreras, C., Gonzalez, F., Ferno, J., Dieguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2015). The brain and brown fat. *Ann Med*, *47*(2), 150-168. doi:10.3109/07853890.2014.919727

- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D. A., . . . Lopez, M. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep*, 9(1), 366-377. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.057
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Seoane-Collazo, P., Martinez-Sanchez, N., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., . . . Lopez, M. (2017). Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes*, 66(1), 87-99. doi:10.2337/db15-1547
- Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Medina-Gomez, G., & Lopez, M. (2016). Hypothalamus and thermogenesis: Heating the BAT, browning the WAT. *Mol Cell Endocrinol*, 438, 107-115. doi:10.1016/j.mce.2016.08.002
- Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Rahmouni, K., & Lopez, M. (2017). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biol*, 12, 854-863. doi:10.1016/j.redox.2017.04.019
- Coppari, R., Ramadori, G., & Elmquist, J. K. (2009). The role of transcriptional regulators in central control of appetite and body weight. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 5(3), 160-166. doi:10.1038/ncpendmet1070
- Cowley, M. A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D. M., Colmers, W. F., & Cone, R. D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*, 24(1), 155-163. doi:10.1016/s0896-6273(00)80829-6
- Cui, H., Lopez, M., & Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol*, 13(6), 338-351. doi:10.1038/nrendo.2016.222
- Currie, P. J., Mirza, A., Fuld, R., Park, D., & Vasselli, J. R. (2005). Ghrelin is an orexigenic and metabolic signaling peptide in the arcuate and paraventricular nuclei. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289(2), R353-R358. doi:10.1152/ajpregu.00756.2004
- Cypess, A. M., & Kahn, C. R. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 17(2), 143-149. doi:10.1097/MED.0b013e328337a81f
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., . . . Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360(15), 1509-1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780
- Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S. H., Kahn, P. A., . . . Kolodny, G. M. (2015). Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab*, 21(1), 33-38. doi:10.1016/j.cmet.2014.12.009
- Czyzyk, T. A., Nogueiras, R., Lockwood, J. F., McKinzie, J. H., Coskun, T., Pintar, J. E., . . . Statnick, M. A. (2010). kappa-Opioid receptors control the metabolic response to a high-energy diet in mice. *FASEB J*, 24(4), 1151-1159. doi:10.1096/fj.09-143610
- D'Souza, M. S., & Markou, A. (2011). Neuronal mechanisms underlying development of nicotine dependence: implications for novel smoking-cessation treatments. *Addict Sci Clin Pract*, 6(1), 4-16. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003417>

- Dakin, C. L., Gunn, I., Small, C. J., Edwards, C. M., Hay, D. L., Smith, D. M., . . . Bloom, S. R. (2001). Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology*, *142*(10), 4244-4250. doi:10.1210/endo.142.10.8430
- Dakin, C. L., Small, C. J., Batterham, R. L., Neary, N. M., Cohen, M. A., Patterson, M., . . . Bloom, S. R. (2004). Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology*, *145*(6), 2687-2695. doi:10.1210/en.2003-1338
- Dandekar, M. P., Nakhate, K. T., Kokare, D. M., & Subhedar, N. K. (2011). Effect of nicotine on feeding and body weight in rats: involvement of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide. *Behav Brain Res*, *219*(1), 31-38. doi:10.1016/j.bbr.2010.12.007
- De Biasi, M., & Dani, J. A. (2011). Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annu Rev Neurosci*, *34*, 105-130. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113734
- de Costa, B. R., Rothman, R. B., Bykov, V., Jacobson, A. E., & Rice, K. C. (1989). Selective and enantiospecific acylation of kappa opioid receptors by (1S,2S)-trans-2-isothiocyanato-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl) cyclohexyl] benzeneacetamide. Demonstration of kappa receptor heterogeneity. *J Med Chem*, *32*(2), 281-283. doi:10.1021/jm00122a001
- DePaoli, A. M., Hurley, K. M., Yasada, K., Reisine, T., & Bell, G. (1994). Distribution of kappa opioid receptor mRNA in adult mouse brain: an in situ hybridization histochemistry study. *Mol Cell Neurosci*, *5*(4), 327-335. doi:10.1006/mcne.1994.1039
- Dhillon, H., Zigman, J. M., Ye, C., Lee, C. E., McGovern, R. A., Tang, V., . . . Lowell, B. B. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*, *49*(2), 191-203. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.021
- Dickson, S. L., Egecioglu, E., Landgren, S., Skibicka, K. P., Engel, J. A., & Jerlhag, E. (2011). The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Mol Cell Endocrinol*, *340*(1), 80-87. doi:10.1016/j.mce.2011.02.017
- Dieguez, C., Fruhbeck, G., & Lopez, M. (2009). Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obes Facts*, *2*(2), 126-135. doi:10.1159/000209251
- Dietrich, M. O., & Horvath, T. L. (2009). Feeding signals and brain circuitry. *Eur J Neurosci*, *30*(9), 1688-1696. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06963.x
- Donny, E. C., Caggiula, A. R., Weaver, M. T., Levin, M. E., & Sved, A. F. (2011). The reinforcement-enhancing effects of nicotine: implications for the relationship between smoking, eating and weight. *Physiol Behav*, *104*(1), 143-148. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.043
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., & Bray, G. A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol*, *260*(2 Pt 2), R328-334. doi:10.1152/ajpregu.1991.260.2.R328
- Eissele, R., Goke, R., Willemer, S., Harthus, H. P., Vermeer, H., Arnold, R., & Goke, B. (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*, *22*(4), 283-291. doi:10.1111/j.1365-2362.1992.tb01464.x

- El Sayed, K. A., & Sylvester, P. W. (2007). Biocatalytic and semisynthetic studies of the anticancer tobacco cembranoids. *Expert Opin Investig Drugs*, 16(6), 877-887. doi:10.1517/13543784.16.6.877
- Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., . . . Elmquist, J. K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*, 23(4), 775-786. doi:10.1016/s0896-6273(01)80035-0
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., . . . Elmquist, J. K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21(6), 1375-1385. doi:10.1016/s0896-6273(00)80656-x
- Elmquist, J. K., Ahima, R. S., Elias, C. F., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2), 741-746. doi:10.1073/pnas.95.2.741
- Elmquist, J. K., Bjorbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, 395(4), 535-547. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619505>
- Elmquist, J. K., Elias, C. F., & Saper, C. B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22(2), 221-232. doi:10.1016/s0896-6273(00)81084-3
- Enriori, P. J., Sinnayah, P., Simonds, S. E., Garcia Rudaz, C., & Cowley, M. A. (2011). Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *J Neurosci*, 31(34), 12189-12197. doi:10.1523/JNEUROSCI.2336-11.2011
- Fekete, C., Kelly, J., Mihaly, E., Sarkar, S., Rand, W. M., Legradi, G., . . . Lechan, R. M. (2001). Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, 142(6), 2606-2613. doi:10.1210/endo.142.6.8207
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W. M., Harney, J. W., Emerson, C. H., Bianco, A. C., . . . Lechan, R. M. (2002). Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, 143(12), 4513-4519. doi:10.1210/en.2002-220574
- Ferenczi, S., Nunez, C., Pinter-Kubler, B., Foldes, A., Martin, F., Markus, V. L., . . . Kovacs, K. J. (2010). Changes in metabolic-related variables during chronic morphine treatment. *Neurochem Int*, 57(3), 323-330. doi:10.1016/j.neuint.2010.06.011
- Filozof, C., Fernandez Pinilla, M. C., & Fernandez-Cruz, A. (2004). Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev*, 5(2), 95-103. doi:10.1111/j.1467-789X.2004.00131.x
- Freeman, J. A. (1977). Possible regulatory function of acetylcholine receptor in maintenance of retinotectal synapses. *Nature*, 269(5625), 218-222. doi:10.1038/269218a0
- Friedman, J. (2016). The long road to leptin. *J Clin Invest*, 126(12), 4727-4734. doi:10.1172/JCI91578
- Friedman, J. M. (2009). Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature*, 459(7245), 340-342. doi:10.1038/459340a

- Fuller, C. A., Horwitz, B. A., & Horowitz, J. M. (1975). Shivering and nonshivering thermogenic responses of cold-exposed rats to hypothalamic warming. *Am J Physiol*, *228*(5), 1519-1524. doi:10.1152/ajplegacy.1975.228.5.1519
- Gao, M., Jin, Y., Yang, K., Zhang, D., Lukas, R. J., & Wu, J. (2010). Mechanisms involved in systemic nicotine-induced glutamatergic synaptic plasticity on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, *30*(41), 13814-13825. doi:10.1523/JNEUROSCI.1943-10.2010
- Garcia, M. C., Lopez, M., Gualillo, O., Seoane, L. M., Dieguez, C., & Senaris, R. M. (2003). Hypothalamic levels of NPY, MCH, and prepro-orexin mRNA during pregnancy and lactation in the rat: role of prolactin. *FASEB J*, *17*(11), 1392-1400. doi:10.1096/fj.02-0933com
- Geary, N., Smith, G. P., & Corp, E. S. (1996). The increased satiating potency of CCK-8 by estradiol is not mediated by upregulation of NTS CCK receptors. *Brain Res*, *719*(1-2), 179-186. doi:10.1016/0006-8993(96)00099-6
- Geerling, J. C., Shin, J. W., Chimenti, P. C., & Loewy, A. D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol*, *518*(9), 1460-1499. doi:10.1002/cne.22283
- Gehlert, D. R., Chronwall, B. M., Schafer, M. P., & O'Donohue, T. L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse*, *1*(1), 25-31. doi:10.1002/syn.890010106
- Gillman, A. G., Kosobud, A. E., & Timberlake, W. (2008). Pre- and post-nicotine circadian activity rhythms can be differentiated by a paired environmental cue. *Physiol Behav*, *93*(1-2), 337-350. doi:10.1016/j.physbeh.2007.09.013
- Gillman, A. G., Kosobud, A. E., & Timberlake, W. (2010). Effects of multiple daily nicotine administrations on pre- and post-nicotine circadian activity episodes in rats. *Behav Neurosci*, *124*(4), 520-531. doi:10.1037/a0020272
- Giniatullin, R., Nistri, A., & Yakel, J. L. (2005). Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci*, *28*(7), 371-378. doi:10.1016/j.tins.2005.04.009
- Goforth, P. B., Leininger, G. M., Patterson, C. M., Satin, L. S., & Myers, M. G., Jr. (2014). Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. *J Neurosci*, *34*(34), 11405-11415. doi:10.1523/JNEUROSCI.5167-13.2014
- Goldstone, A. P. (2006). The hypothalamus, hormones, and hunger: alterations in human obesity and illness. *Prog Brain Res*, *153*, 57-73. doi:10.1016/S0079-6123(06)53003-1
- Gomez, G., Lambertz, I., Udupi, V., Qi, X., Thompson, J. C., & Greeley, G. H., Jr. (1996). Influence of nicotine on gastrin and peptide YY in the rat. *Regul Pept*, *67*(1), 55-61. doi:10.1016/S0167-0115(96)00107-3
- Gonzalez-Garcia, I., Contreras, C., Estevez-Salguero, A., Ruiz-Pino, F., Colsh, B., Pensado, I., . . . Lopez, M. (2018). Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. *Cell Rep*, *25*(2), 413-423 e415. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.038

- Gonzalez-Garcia, I., Tena-Sempere, M., & Lopez, M. (2017). Estradiol Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Adv Exp Med Biol*, 1043, 315-335. doi:10.1007/978-3-319-70178-3_15
- Gori, G. B., Benowitz, N. L., & Lynch, C. J. (1986). Mouth versus deep airways absorption of nicotine in cigarette smokers. *Pharmacol Biochem Behav*, 25(6), 1181-1184. doi:10.1016/0091-3057(86)90108-5
- Gosnell, B. A., Levine, A. S., & Morley, J. E. (1986). The stimulation of food intake by selective agonists of mu, kappa and delta opioid receptors. *Life Sci*, 38(12), 1081-1088. doi:10.1016/0024-3205(86)90243-2
- Gotti C, M. M., Millar NS, Wonnacott S. (2019). Nicotinic acetylcholine receptors (version 2019.4) Retrieved from <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F76/2019.4>
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol Sci*, 27(9), 482-491. doi:10.1016/j.tips.2006.07.004
- Grady, S. R., Salminen, O., Laverty, D. C., Whiteaker, P., McIntosh, J. M., Collins, A. C., & Marks, M. J. (2007). The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochem Pharmacol*, 74(8), 1235-1246. doi:10.1016/j.bcp.2007.07.032
- Graham, M., Shutter, J. R., Sarmiento, U., Sarosi, I., & Stark, K. L. (1997). Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet*, 17(3), 273-274. doi:10.1038/ng1197-273
- Grana, R., Benowitz, N., & Glantz, S. A. (2014). E-cigarettes: a scientific review. *Circulation*, 129(19), 1972-1986. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667
- Granneman, J. G. (1988). Norepinephrine infusions increase adenylate cyclase responsiveness in brown adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther*, 245(3), 1075-1080. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2838602>
- Grizzell, J. A., & Echeverria, V. (2015). New Insights into the Mechanisms of Action of Cotinine and its Distinctive Effects from Nicotine. *Neurochem Res*, 40(10), 2032-2046. doi:10.1007/s11064-014-1359-2
- Grunberg, N. E., Bowen, D. J., Maycock, V. A., & Nesor, S. M. (1985). The importance of sweet taste and caloric content in the effects of nicotine on specific food consumption. *Psychopharmacology (Berl)*, 87(2), 198-203. doi:10.1007/bf00431807
- Grunberg, N. E., Bowen, D. J., & Winders, S. E. (1986). Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 90(1), 101-105. doi:10.1007/bf00172879
- Grundey, J., Thirugnanasambandam, N., Kaminsky, K., Drees, A., Skwirba, A. C., Lang, N., . . . Nitsche, M. A. (2012a). Neuroplasticity in cigarette smokers is altered under withdrawal and partially restituted by nicotine exposition. *J Neurosci*, 32(12), 4156-4162. doi:10.1523/JNEUROSCI.3660-11.2012
- Grundey, J., Thirugnanasambandam, N., Kaminsky, K., Drees, A., Skwirba, A. C., Lang, N., . . . Nitsche, M. A. (2012b). Rapid effect of nicotine intake on neuroplasticity in non-smoking humans. *Front Pharmacol*, 3, 186. doi:10.3389/fphar.2012.00186

- Guan, X. M., Yu, H., Trumbauer, M., Frazier, E., Van der Ploeg, L. H., & Chen, H. (1998). Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport*, *9*(15), 3415-3419. doi:10.1097/00001756-199810260-00015
- Guerra, C., Navarro, P., Valverde, A. M., Arribas, M., Bruning, J., Kozak, L. P., . . . Benito, M. (2001). Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest*, *108*(8), 1205-1213. doi:10.1172/JCI13103
- Guieu, J. D., & Hardy, J. D. (1970). Effects of heating and cooling of the spinal cord on preoptic unit activity. *J Appl Physiol*, *29*(5), 675-683. doi:10.1152/jappl.1970.29.5.675
- Gunawardana, S. C., & Piston, D. W. (2012). Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes*, *61*(3), 674-682. doi:10.2337/db11-0510
- Hagan, J. J., Leslie, R. A., Patel, S., Evans, M. L., Wattam, T. A., Holmes, S., . . . Upton, N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(19), 10911-10916. doi:10.1073/pnas.96.19.10911
- Hara, J., Beuckmann, C. T., Nambu, T., Willie, J. T., Chemelli, R. M., Sinton, C. M., . . . Sakurai, T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron*, *30*(2), 345-354. doi:10.1016/s0896-6273(01)00293-8
- Harrold, J. A., Widdowson, P. S., & Williams, G. (1999). Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes*, *48*(2), 267-271. doi:10.2337/diabetes.48.2.267
- Henningfield, J. E., & Keenan, R. M. (1993). Nicotine delivery kinetics and abuse liability. *J Consult Clin Psychol*, *61*(5), 743-750. doi:10.1037//0022-006x.61.5.743
- Henry, B. A., Rao, A., Ikenasio, B. A., Mountjoy, K. G., Tilbrook, A. J., & Clarke, I. J. (2001). Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and agouti related-protein in chronically food-restricted sheep. *Brain Res*, *918*(1-2), 40-50. doi:10.1016/s0006-8993(01)02918-3
- Herwig, A., Ross, A. W., Nilaweera, K. N., Morgan, P. J., & Barrett, P. (2008). Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts*, *1*(2), 71-79. doi:10.1159/000123428
- Hill, J. W. (2012). PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab*, *16*(Suppl 3), S627-636. doi:10.4103/2230-8210.105581
- Hill, J. W., Elmquist, J. K., & Elias, C. F. (2008). Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *294*(5), E827-832. doi:10.1152/ajpendo.00670.2007
- Hogan, S., Coscina, D. V., & Himms-Hagen, J. (1982). Brown adipose tissue of rats with obesity-inducing ventromedial hypothalamic lesions. *Am J Physiol*, *243*(4), E338-344. doi:10.1152/ajpendo.1982.243.4.E338
- Hogg, R. C., Raggenbass, M., & Bertrand, D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, *147*, 1-46. doi:10.1007/s10254-003-0005-1

- Holbrook, B. D. (2016). The effects of nicotine on human fetal development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 108(2), 181-192. doi:10.1002/bdrc.21128
- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B., & Belfrage, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci Rep*, 7(11), 897-904. doi:10.1007/bf01119481
- Holt, S. J., Wheal, H. V., & York, D. A. (1987). Hypothalamic control of brown adipose tissue in Zucker lean and obese rats. Effect of electrical stimulation of the ventromedial nucleus and other hypothalamic centres. *Brain Res*, 405(2), 227-233. doi:10.1016/0006-8993(87)90292-7
- Holtzman, S. G. (1979). Suppression of appetitive behavior in the rat by naloxone: lack of effect of prior morphine dependence. *Life Sci*, 24(3), 219-226. doi:10.1016/0024-3205(79)90222-4
- Horvath, T. L., Diano, S., & van den Pol, A. N. (1999). 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(3), 1072-1087. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9920670>
- Hory-Lee, F., & Frank, E. (1995). The nicotinic blocking agents d-tubocurarine and alpha-bungarotoxin save motoneurons from naturally occurring death in the absence of neuromuscular blockade. *J Neurosci*, 15(10), 6453-6460. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7472408>
- Hu, T., Yang, Z., & Li, M. D. (2018). Pharmacological Effects and Regulatory Mechanisms of Tobacco Smoking Effects on Food Intake and Weight Control. *J Neuroimmune Pharmacol*, 13(4), 453-466. doi:10.1007/s11481-018-9800-y
- Hu, Y., Bloomquist, B. T., Cornfield, L. J., DeCarr, L. B., Flores-Riveros, J. R., Friedman, L., . . . McCaleb, M. L. (1996). Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem*, 271(42), 26315-26319. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824284>
- Huang, L. Z., & Winzer-Serhan, U. H. (2007). Nicotine regulates mRNA expression of feeding peptides in the arcuate nucleus in neonatal rat pups. *Dev Neurobiol*, 67(3), 363-377. doi:10.1002/dneu.20348
- Hugie, T., Halvorson, I., & Thornhill, J. (1992). Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, 575(1), 57-62. doi:10.1016/0006-8993(92)90422-6
- Hukkanen, J., Jacob, P., 3rd, & Benowitz, N. L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, 57(1), 79-115. doi:10.1124/pr.57.1.3
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., . . . Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88(1), 131-141. doi:10.1016/s0092-8674(00)81865-6
- Imai-Matsumura, K., Matsumura, K., & Nakayama, T. (1984). Involvement of ventromedial hypothalamus in brown adipose tissue thermogenesis induced by preoptic cooling in rats. *Jpn J Physiol*, 34(5), 939-943. doi:10.2170/jjphysiol.34.939

- Imbernon, M., Beiroa, D., Vazquez, M. J., Morgan, D. A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., . . . Nogueiras, R. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology*, *144*(3), 636-649 e636. doi:10.1053/j.gastro.2012.10.051
- Ishii, M., & Kurachi, Y. (2006). Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*, *12*(28), 3573-3581. doi:10.2174/138161206778522056
- Itier, V., & Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett*, *504*(3), 118-125. doi:10.1016/s0014-5793(01)02702-8
- Jain, R., Mukherjee, K., & Balhara, Y. P. (2008). The role of NMDA receptor antagonists in nicotine tolerance, sensitization, and physical dependence: a preclinical review. *Yonsei Med J*, *49*(2), 175-188. doi:10.3349/ymj.2008.49.2.175
- James, I. F., Chavkin, C., & Goldstein, A. (1982). Selectivity of dynorphin for kappa opioid receptors. *Life Sci*, *31*(12-13), 1331-1334. doi:10.1016/0024-3205(82)90374-5
- Janecka, A., Fichna, J., & Janecki, T. (2004). Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem*, *4*(1), 1-17. doi:10.2174/1568026043451618
- Jänig, W. (2006). *The integrative action of the autonomic nervous system : neurobiology of homeostasis*. Cambridge: UK.
- Jansen, A. S., Hoffman, J. L., & Loewy, A. D. (1997). CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res*, *766*(1-2), 29-38. doi:10.1016/s0006-8993(97)00532-5
- JC, d. W. (2013). *Using the Student's t-test with extremely small sample sizes.: Practical Assessment, Research & Evaluation*.
- Jensen, A. A., Frolund, B., Liljefors, T., & Krosgaard-Larsen, P. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem*, *48*(15), 4705-4745. doi:10.1021/jm040219e
- Jespersen, N. Z., Larsen, T. J., Peijs, L., Daugaard, S., Homoe, P., Loft, A., . . . Scheele, C. (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab*, *17*(5), 798-805. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.011
- Jin, Y., Yang, K., Wang, H., & Wu, J. (2011). Exposure of nicotine to ventral tegmental area slices induces glutamatergic synaptic plasticity on dopamine neurons. *Synapse*, *65*(4), 332-338. doi:10.1002/syn.20850
- Jo, Y. H., & Role, L. W. (2002). Cholinergic modulation of purinergic and GABAergic co-transmission at in vitro hypothalamic synapses. *J Neurophysiol*, *88*(5), 2501-2508. doi:10.1152/jn.00352.2002
- Jo, Y. H., Talmage, D. A., & Role, L. W. (2002). Nicotinic receptor-mediated effects on appetite and food intake. *J Neurobiol*, *53*(4), 618-632. doi:10.1002/neu.10147

- Jo, Y. H., Wiedl, D., & Role, L. W. (2005). Cholinergic modulation of appetite-related synapses in mouse lateral hypothalamic slice. *J Neurosci*, 25(48), 11133-11144. doi:10.1523/JNEUROSCI.3638-05.2005
- Jones, S., Sudweeks, S., & Yakel, J. L. (1999). Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci*, 22(12), 555-561. doi:10.1016/s0166-2236(99)01471-x
- Jordan, B. A., & Devi, L. A. (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, 399(6737), 697-700. doi:10.1038/21441
- Jureus, A., Cunningham, M. J., McClain, M. E., Clifton, D. K., & Steiner, R. A. (2000). Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology*, 141(7), 2703-2706. doi:10.1210/endo.141.7.7669
- Kabbani, N., Nordman, J. C., Corgiat, B. A., Veltri, D. P., Shehu, A., Seymour, V. A., & Adams, D. J. (2013). Are nicotinic acetylcholine receptors coupled to G proteins? *Bioessays*, 35(12), 1025-1034. doi:10.1002/bies.201300082
- Kageyama, H., Takenoya, F., Shiba, K., & Shioda, S. (2010). Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides*, 44(2), 133-138. doi:10.1016/j.npep.2009.11.010
- Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M. P., Ruas, J. L., . . . Spiegelman, B. M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes Dev*, 22(10), 1397-1409. doi:10.1101/gad.1666108
- Kane, M. A., Folias, A. E., Pingitore, A., Perri, M., Krois, C. R., Ryu, J. Y., . . . Napoli, J. L. (2011). Crbp1 modulates glucose homeostasis and pancreas 9-cis-retinoic acid concentrations. *Mol Cell Biol*, 31(16), 3277-3285. doi:10.1128/MCB.05516-11
- Kao, L. S., & Green, C. E. (2008). Analysis of variance: is there a difference in means and what does it mean? *J Surg Res*, 144(1), 158-170. doi:10.1016/j.jss.2007.02.053
- Keipert, S., & Jastroch, M. (2014). Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta*, 1837(7), 1075-1082. doi:10.1016/j.bbabbio.2014.02.008
- Kelly, L., & Bielajew, C. (1991). Ventromedial hypothalamic regulation of brown adipose tissue. *Neuroreport*, 2(1), 41-44. doi:10.1097/00001756-199101000-00010
- Kim, B. (2008). Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid*, 18(2), 141-144. doi:10.1089/thy.2007.0266
- King, B. M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav*, 87(2), 221-244. doi:10.1016/j.physbeh.2005.10.007
- Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Mountjoy, K. G., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, 457(3), 213-235. doi:10.1002/cne.10454

- Kishioka, S., Kiguchi, N., Kobayashi, Y., & Saika, F. (2014). Nicotine effects and the endogenous opioid system. *J Pharmacol Sci*, *125*(2), 117-124. doi:10.1254/jphs.14r03cp
- Kissileff, H. R., Carretta, J. C., Geliebter, A., & Pi-Sunyer, F. X. (2003). Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *285*(5), R992-998. doi:10.1152/ajpregu.00272.2003
- Klink, R., de Kerchove d'Exaerde, A., Zoli, M., & Changeux, J. P. (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci*, *21*(5), 1452-1463. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222635>
- Klockener, T., Hess, S., Belgardt, B. F., Paeger, L., Verhagen, L. A., Husch, A., . . . Bruning, J. C. (2011). High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat Neurosci*, *14*(7), 911-918. doi:10.1038/nn.2847
- Kohlmeier, K. A. (2015). Nicotine during pregnancy: changes induced in neurotransmission, which could heighten proclivity to addict and induce maladaptive control of attention. *J Dev Orig Health Dis*, *6*(3), 169-181. doi:10.1017/S2040174414000531
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, *404*(6778), 635-643. doi:10.1038/35007508
- Kotz, C. M., Wang, C. F., Briggs, J. E., Levine, A. S., & Billington, C. J. (2000). Effect of NPY in the hypothalamic paraventricular nucleus on uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *278*(2), R494-498. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.2.R494
- Kozlowski, L. T., Mehta, N. Y., Sweeney, C. T., Schwartz, S. S., Vogler, G. P., Jarvis, M. J., & West, R. J. (1998). Filter ventilation and nicotine content of tobacco in cigarettes from Canada, the United Kingdom, and the United States. *Tob Control*, *7*(4), 369-375. doi:10.1136/tc.7.4.369
- Kramer, P. R., Kramer, S. F., Marr, K., Guan, G., Wellman, P. J., & Bellinger, L. L. (2007). Nicotine administration effects on feeding and cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) expression in the hypothalamus. *Regul Pept*, *138*(2-3), 66-73. doi:10.1016/j.regpep.2006.08.002
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., . . . Hastrup, S. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*, *393*(6680), 72-76. doi:10.1038/29993
- Kurrasch, D. M., Cheung, C. C., Lee, F. Y., Tran, P. V., Hata, K., & Ingraham, H. A. (2007). The neonatal ventromedial hypothalamus transcriptome reveals novel markers with spatially distinct patterning. *J Neurosci*, *27*(50), 13624-13634. doi:10.1523/JNEUROSCI.2858-07.2007
- Labbe, S. M., Caron, A., Lanfray, D., Monge-Rofarello, B., Bartness, T. J., & Richard, D. (2015). Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Syst Neurosci*, *9*, 150. doi:10.3389/fnsys.2015.00150
- Lage, R., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., & Lopez, M. (2016). Contribution of adaptive thermogenesis to the hypothalamic regulation of energy balance. *Biochem J*, *473*(22), 4063-4082. doi:10.1042/BCJ20160012
- Lambert, P. D., Couceyro, P. R., McGirr, K. M., Dall Vechia, S. E., Smith, Y., & Kuhar, M. J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse*, *29*(4), 293-298. doi:10.1002/(SICI)1098-2396(199808)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0

- Laudon Meyer, E., Waldenlind, E., & Marcus, C. (2005). Lipolysis in smokers during tobacco withdrawal: a pilot study. *Scand J Clin Lab Invest*, 65(8), 649-657. doi:10.1080/00365510500333510
- Le Houezec, J. (2003). Role of nicotine pharmacokinetics in nicotine addiction and nicotine replacement therapy: a review. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7(9), 811-819. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12971663>
- Le Novere, N., & Changeux, J. P. (1995). Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol*, 40(2), 155-172. doi:10.1007/bf00167110
- Lee, P., Werner, C. D., Kebebew, E., & Celi, F. S. (2014). Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int J Obes (Lond)*, 38(2), 170-176. doi:10.1038/ijo.2013.82
- Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Hirsch, J. (1995). Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med*, 332(10), 621-628. doi:10.1056/NEJM199503093321001
- Leonardsson, G., Steel, J. H., Christian, M., Pocock, V., Milligan, S., Bell, J., . . . Parker, M. G. (2004). Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(22), 8437-8442. doi:10.1073/pnas.0401013101
- Levine, A., Huang, Y., Drisaldi, B., Griffin, E. A., Jr., Pollak, D. D., Xu, S., . . . Kandel, E. R. (2011). Molecular mechanism for a gateway drug: epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. *Sci Transl Med*, 3(107), 107ra109. doi:10.1126/scitranslmed.3003062
- Levine, A. S., Grace, M., & Billington, C. J. (1991). Beta-funaltrexamine (beta-FNA) decreases deprivation and opioid-induced feeding. *Brain Res*, 562(2), 281-284. doi:10.1016/0006-8993(91)90632-6
- Li, C., Chen, P., & Smith, M. S. (2000). 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(1-2), 122-129. doi:10.1016/s0006-8993(99)02324-0
- Li, Y. Z., & Davidowa, H. (2004). Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J Neurosci Res*, 77(4), 596-602. doi:10.1002/jnr.20192
- Liao, G. Y., An, J. J., Gharami, K., Waterhouse, E. G., Vanevski, F., Jones, K. R., & Xu, B. (2012). Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nat Med*, 18(4), 564-571. doi:10.1038/nm.2687
- Lim, S., Honek, J., Xue, Y., Seki, T., Cao, Z., Andersson, P., . . . Cao, Y. (2012). Cold-induced activation of brown adipose tissue and adipose angiogenesis in mice. *Nat Protoc*, 7(3), 606-615. doi:10.1038/nprot.2012.013
- Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Estevez-Salguero, A., Milbank, E., Gonzalez-Garcia, I., Rodriguez, C., . . . Lopez, M. (2018). Genetic Targeting of GRP78 in the VMH Improves Obesity Independently of Food Intake. *Genes (Basel)*, 9(7). doi:10.3390/genes9070357

- Lindberg, D., Chen, P., & Li, C. (2013). Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *J Comp Neurol*, *521*(14), 3167-3190. doi:10.1002/cne.23338
- Lindstrom, J. M. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci*, *998*, 41-52. doi:10.1196/annals.1254.007
- Liu, R. H., Mizuta, M., & Matsukura, S. (2004). The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, *310*(1), 52-58. doi:10.1124/jpet.103.065037
- Lopez, M., Lage, R., Saha, A. K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M. J., Varela, L., . . . Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*, *7*(5), 389-399. doi:10.1016/j.cmet.2008.03.006
- Lopez, M., Lelliott, C. J., & Vidal-Puig, A. (2007). Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays*, *29*(3), 248-261. doi:10.1002/bies.20539
- Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol*, *12*(7), 421-432. doi:10.1038/nrendo.2016.67
- Lopez, M., Seoane, L., Garcia, M. C., Lago, F., Casanueva, F. F., Senaris, R., & Dieguez, C. (2000). Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun*, *269*(1), 41-45. doi:10.1006/bbrc.2000.2245
- Lopez, M., & Tena-Sempere, M. (2017). Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacol Ther*, *178*, 109-122. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.03.014
- Lopez, M., Varela, L., Vazquez, M. J., Rodriguez-Cuenca, S., Gonzalez, C. R., Velagapudi, V. R., . . . Vidal-Puig, A. (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med*, *16*(9), 1001-1008. doi:10.1038/nm.2207
- Lopez-Valpuesta, F. J., Nyce, J. W., Griffin-Biggs, T. A., Ice, J. C., & Myers, R. D. (1996). Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc Biol Sci*, *263*(1372), 881-886. doi:10.1098/rspb.1996.0130
- Lowell, B. B., & Bachman, E. S. (2003). Beta-Adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem*, *278*(32), 29385-29388. doi:10.1074/jbc.R300011200
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, *404*(6778), 652-660. doi:10.1038/35007527
- Lu, B., Kwan, K., Levine, Y. A., Olofsson, P. S., Yang, H., Li, J., . . . Tracey, K. J. (2014). alpha7 nicotinic acetylcholine receptor signaling inhibits inflammasome activation by preventing mitochondrial DNA release. *Mol Med*, *20*, 350-358. doi:10.2119/molmed.2013.00117

- Lubkin, M., & Stricker-Krongrad, A. (1998). Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(2), 241-245. doi:10.1006/bbrc.1998.9750
- Lupien, J. R., & Bray, G. A. (1988). Nicotine increases thermogenesis in brown adipose tissue in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 29(1), 33-37. doi:10.1016/0091-3057(88)90269-9
- Lyons, W. E., Mamounas, L. A., Ricaurte, G. A., Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., . . . Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15239-15244. doi:10.1073/pnas.96.26.15239
- Magnan, C., Levin, B. E., & Luquet, S. (2015). Brain lipid sensing and the neural control of energy balance. *Mol Cell Endocrinol*, 418 Pt 1, 3-8. doi:10.1016/j.mce.2015.09.019
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L., . . . Parker, K. L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology*, 143(2), 607-614. doi:10.1210/endo.143.2.8652
- Malenka, R. C. N., E. J.; Hyman, S. E. . (2009). Autonomic Nervous System. In *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (pp. 234). New York: McGraw-Hill Medical.
- Mangubat, M., Lutfy, K., Lee, M. L., Pulido, L., Stout, D., Davis, R., . . . Friedman, T. C. (2012). Effect of nicotine on body composition in mice. *J Endocrinol*, 212(3), 317-326. doi:10.1530/JOE-11-0350
- Mano-Otagiri, A., Iwasaki-Sekino, A., Nemoto, T., Ohata, H., Shuto, Y., Nakabayashi, H., . . . Shibasaki, T. (2010). Genetic suppression of ghrelin receptors activates brown adipocyte function and decreases fat storage in rats. *Regul Pept*, 160(1-3), 81-90. doi:10.1016/j.regpep.2009.11.010
- Mano-Otagiri, A., Iwasaki-Sekino, A., Ohata, H., Arai, K., & Shibasaki, T. (2009). Nicotine suppresses energy storage through activation of sympathetic outflow to brown adipose tissue via corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Neurosci Lett*, 455(1), 26-29. doi:10.1016/j.neulet.2009.03.054
- Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*, 18(1), 22-29. doi:10.1016/0166-2236(95)93946-u
- Mansvelder, H. D., Keath, J. R., & McGehee, D. S. (2002). Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron*, 33(6), 905-919. doi:10.1016/s0896-6273(02)00625-6
- Mansvelder, H. D., & McGehee, D. S. (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron*, 27(2), 349-357. doi:10.1016/s0896-6273(00)00042-8
- Marieb, E. N. H., K. (2007). *Human anatomy & physiology* (7th ed. ed.). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.

- Marks, J. L., Porte, D., Jr., Stahl, W. L., & Baskin, D. G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*, *127*(6), 3234-3236. doi:10.1210/endo-127-6-3234
- Martinez de Morentin, P. B., Gonzalez-Garcia, I., Martins, L., Lage, R., Fernandez-Mallo, D., Martinez-Sanchez, N., . . . Lopez, M. (2014). Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab*, *20*(1), 41-53. doi:10.1016/j.cmet.2014.03.031
- Martinez de Morentin, P. B., Whittle, A. J., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., & Lopez, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, *61*(4), 807-817. doi:10.2337/db11-1079
- Martinez-Sanchez, N., Moreno-Navarrete, J. M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Ferno, J., Nogueiras, R., . . . Lopez, M. (2017). Thyroid hormones induce browning of white fat. *J Endocrinol*, *232*(2), 351-362. doi:10.1530/JOE-16-0425
- Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., . . . Lopez, M. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab*, *26*(1), 212-229 e212. doi:10.1016/j.cmet.2017.06.014
- Martins, L., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Gonzalez, F., . . . Lopez, M. (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep*, *16*(8), 2231-2242. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.045
- Marty, M. A., Erwin, V. G., Cornell, K., & Zgombick, J. M. (1985). Effects of nicotine on beta-endorphin, alpha MSH, and ACTH secretion by isolated perfused mouse brains and pituitary glands, in vitro. *Pharmacol Biochem Behav*, *22*(2), 317-325. doi:10.1016/0091-3057(85)90397-1
- Mayer, B. (2014). How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. *Arch Toxicol*, *88*(1), 5-7. doi:10.1007/s00204-013-1127-0
- McClellan, K. M., Parker, K. L., & Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*, *27*(2), 193-209. doi:10.1016/j.yfrne.2006.02.002
- McDonald, C. G., Eppolito, A. K., Brielmaier, J. M., Smith, L. N., Bergstrom, H. C., Lawhead, M. R., & Smith, R. F. (2007). Evidence for elevated nicotine-induced structural plasticity in nucleus accumbens of adolescent rats. *Brain Res*, *1151*, 211-218. doi:10.1016/j.brainres.2007.03.019
- McGehee, D. S. (1999). Molecular diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann NY Acad Sci*, *868*, 565-577. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb11330.x
- McGehee, D. S., & Role, L. W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol*, *57*, 521-546. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.002513
- McGehee, D. S., & Role, L. W. (1996). Presynaptic ionotropic receptors. *Curr Opin Neurobiol*, *6*(3), 342-349. doi:10.1016/s0959-4388(96)80118-8

- Megerdichian, C. L., Rees, V. W., Wayne, G. F., & Connolly, G. N. (2007). Internal tobacco industry research on olfactory and trigeminal nerve response to nicotine and other smoke components. *Nicotine Tob Res*, 9(11), 1119-1129. doi:10.1080/14622200701648458
- Mercader, J., Ribot, J., Murano, I., Felipe, F., Cinti, S., Bonet, M. L., & Palou, A. (2006). Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology*, 147(11), 5325-5332. doi:10.1210/en.2006-0760
- Mercer, J. G., Hoggard, N., Williams, L. M., Lawrence, C. B., Hannah, L. T., & Trayhurn, P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*, 387(2-3), 113-116. doi:10.1016/0014-5793(96)00473-5
- Meyer, C. W., Willershauser, M., Jastroch, M., Rourke, B. C., Fromme, T., Oelkrug, R., . . . Klingenspor, M. (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 299(5), R1396-1406. doi:10.1152/ajpregu.00021.2009
- Mihaly, E., Fekete, C., Legradi, G., & Lechan, R. M. (2001). Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res*, 891(1-2), 20-31. doi:10.1016/s0006-8993(00)03094-8
- Milton, J. S. (2007). *Estadística para biología y ciencias de la salud*: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- Mineur, Y. S., Abizaid, A., Rao, Y., Salas, R., DiLeone, R. J., Gundisch, D., . . . Picciotto, M. R. (2011). Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science*, 332(6035), 1330-1332. doi:10.1126/science.1201889
- Minokoshi, Y., Saito, M., & Shimazu, T. (1986). Sympathetic denervation impairs responses of brown adipose tissue to VMH stimulation. *Am J Physiol*, 251(5 Pt 2), R1005-1008. doi:10.1152/ajpregu.1986.251.5.R1005
- Miyasato, K. (2013). [Psychiatric and psychological features of nicotine dependence]. *Nihon Rinsho*, 71(3), 477-481. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23631239>
- Mjos, O. D. (1988). Lipid effects of smoking. *Am Heart J*, 115(1 Pt 2), 272-275. doi:10.1016/0002-8703(88)90649-7
- Monge-Roffarello, B., Labbe, S. M., Lenglos, C., Caron, A., Lanfray, D., Samson, P., & Richard, D. (2014). The medial preoptic nucleus as a site of the thermogenic and metabolic actions of melanotan II in male rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 307(2), R158-166. doi:10.1152/ajpregu.00059.2014
- Moran, T. H., & Kinzig, K. P. (2004). Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 286(2), G183-188. doi:10.1152/ajpgi.00434.2003
- Morimoto, C., Kameda, K., Tsujita, T., & Okuda, H. (2001). Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res*, 42(1), 120-127. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160373>

- Morris, D. L., & Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297(6), E1247-1259. doi:10.1152/ajpendo.00274.2009
- Morrison, S. D., Barnett, R. J., & Mayer, J. (1958). Localization of lesions in the lateral hypothalamus of rats with induced adipsia and aphagia. *Am J Physiol*, 193(1), 230-234. doi:10.1152/ajplegacy.1958.193.1.230
- Morrison, S. F. (1999). RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am J Physiol*, 276(4), R962-973. doi:10.1152/ajpregu.1999.276.4.R962
- Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab*, 19(5), 741-756. doi:10.1016/j.cmet.2014.02.007
- Muller, T. D., Clemmensen, C., Finan, B., DiMarchi, R. D., & Tschop, M. H. (2018). Anti-Obesity Therapy: from Rainbow Pills to Polyagonists. *Pharmacol Rev*, 70(4), 712-746. doi:10.1124/pr.117.014803
- Murphy, K. G., & Bloom, S. R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature*, 444(7121), 854-859. doi:10.1038/nature05484
- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 301(5), R1207-1228. doi:10.1152/ajpregu.00109.2011
- Nakhate, K. T., Dandekar, M. P., Kokare, D. M., & Subhedar, N. K. (2009). Involvement of neuropeptide Y Y(1) receptors in the acute, chronic and withdrawal effects of nicotine on feeding and body weight in rats. *Eur J Pharmacol*, 609(1-3), 78-87. doi:10.1016/j.ejphar.2009.03.008
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2), E444-452. doi:10.1152/ajpendo.00691.2006
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2013). UCP1 mRNA does not produce heat. *Biochim Biophys Acta*, 1831(5), 943-949. doi:10.1016/j.bbali.2013.01.009
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2014). The browning of white adipose tissue: some burning issues. *Cell Metab*, 20(3), 396-407. doi:10.1016/j.cmet.2014.07.005
- Nicholls, D. G., & Locke, R. M. (1984). Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev*, 64(1), 1-64. doi:10.1152/physrev.1984.64.1.1
- Nixon, J. P., Kotz, C. M., Novak, C. M., Billington, C. J., & Teske, J. A. (2012). Neuropeptides controlling energy balance: orexins and neuromedins. *Handb Exp Pharmacol*(209), 77-109. doi:10.1007/978-3-642-24716-3_4
- Nogueiras, R., Dieguez, C., & Lopez, M. (2015). Come to Where Insulin Resistance Is, Come to AMPK Country. *Cell Metab*, 21(5), 663-665. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.021

- Nogueiras, R., Romero-Pico, A., Vazquez, M. J., Novelle, M. G., Lopez, M., & Dieguez, C. (2012). The opioid system and food intake: homeostatic and hedonic mechanisms. *Obes Facts*, *5*(2), 196-207. doi:10.1159/000338163
- Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., & Kajimura, S. (2012). PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*, *15*(3), 395-404. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.019
- Oliveira-Maia, A. J., Stapleton-Kotloski, J. R., Lyall, V., Phan, T. H., Mummalaneni, S., Melone, P., . . . Simon, S. A. (2009). Nicotine activates TRPM5-dependent and independent taste pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(5), 1596-1601. doi:10.1073/pnas.0810184106
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., & Barsh, G. S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, *278*(5335), 135-138. doi:10.1126/science.278.5335.135
- Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, *164*(3880), 719-721. doi:10.1126/science.164.3880.719
- Palkovits, M. (2003). Hypothalamic regulation of food intake. *Idegyogy Sz*, *56*(9-10), 288-302. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14608950>
- Pandit, R., de Jong, J. W., Vanderschuren, L. J., & Adan, R. A. (2011). Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond. *Eur J Pharmacol*, *660*(1), 28-42. doi:10.1016/j.ejphar.2011.01.034
- Pankow, J. F. (2001). A consideration of the role of gas/particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract. *Chem Res Toxicol*, *14*(11), 1465-1481. doi:10.1021/tx0100901
- Parrott, A. C. (1998). Nesbitt's Paradox resolved? Stress and arousal modulation during cigarette smoking. *Addiction*, *93*(1), 27-39. doi:10.1046/j.1360-0443.1998.931274.x
- Parrott, A. C. (2003). Cigarette-derived nicotine is not a medicine. *World J Biol Psychiatry*, *4*(2), 49-55. doi:10.3109/15622970309167951
- Parrott, A. C. (2006). Nicotine psychobiology: how chronic-dose prospective studies can illuminate some of the theoretical issues from acute-dose research. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*(3-4), 567-576. doi:10.1007/s00213-005-0294-y
- Parrott, A. C. (2015). Why all stimulant drugs are damaging to recreational users: an empirical overview and psychobiological explanation. *Hum Psychopharmacol*, *30*(4), 213-224. doi:10.1002/hup.2468
- Pasumarthi, R. K., & Fadel, J. (2010). Stimulation of lateral hypothalamic glutamate and acetylcholine efflux by nicotine: implications for mechanisms of nicotine-induced activation of orexin neurons. *J Neurochem*, *113*(4), 1023-1035. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.06666.x
- Pasumarthi, R. K., Reznikov, L. R., & Fadel, J. (2006). Activation of orexin neurons by acute nicotine. *Eur J Pharmacol*, *535*(1-3), 172-176. doi:10.1016/j.ejphar.2006.02.021

- Perkins, M. N., Rothwell, N. J., Stock, M. J., & Stone, T. W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature*, *289*(5796), 401-402. doi:10.1038/289401a0
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*, *285*(10), 7153-7164. doi:10.1074/jbc.M109.053942
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci*, *18*(23), 9996-10015. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822755>
- Picciotto, M. R., & Mineur, Y. S. (2014). Molecules and circuits involved in nicotine addiction: The many faces of smoking. *Neuropharmacology*, *76 Pt B*, 545-553. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.04.028
- Pidoplichko, V. I., Noguchi, J., Areola, O. O., Liang, Y., Peterson, J., Zhang, T., & Dani, J. A. (2004). Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learn Mem*, *11*(1), 60-69. doi:10.1101/lm.70004
- Pomerleau, O. F., & Pomerleau, C. S. (1984). Neuroregulators and the reinforcement of smoking: towards a biobehavioral explanation. *Neurosci Biobehav Rev*, *8*(4), 503-513. doi:10.1016/0149-7634(84)90007-1
- Pomerleau, O. F., & Rosecrans, J. (1989). Neuroregulatory effects of nicotine. *Psychoneuroendocrinology*, *14*(6), 407-423. doi:10.1016/0306-4530(89)90040-1
- Powelka, A. M., Seth, A., Virbasius, J. V., Kiskinis, E., Nicoloro, S. M., Guilherme, A., . . . Czech, M. P. (2006). Suppression of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis by the transcriptional corepressor RIP140 in mouse adipocytes. *J Clin Invest*, *116*(1), 125-136. doi:10.1172/JCI26040
- Preston, E., Triandafillou, J., & Haas, N. (1989). Colchicine lesions of ventromedial hypothalamus: effects on regulatory thermogenesis in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, *32*(1), 301-307. doi:10.1016/0091-3057(89)90247-5
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, *92*(6), 829-839. doi:10.1016/s0092-8674(00)81410-5
- Purves, D., George J. Augustine, David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony-Samuel LaMantia, James O. McNamara, and Leonard E. White (2008). *Neuroscience* (4th ed. ed. Vol. 6): Sinauer Associates.
- Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M. A., Cullen, M. J., . . . Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, *380*(6571), 243-247. doi:10.1038/380243a0

- Rahman, M. A., Hann, N., Wilson, A., & Worrall-Carter, L. (2014). Electronic cigarettes: patterns of use, health effects, use in smoking cessation and regulatory issues. *Tob Induc Dis*, *12*(1), 21. doi:10.1186/1617-9625-12-21
- Ramos, E. J., Meguid, M. M., Zhang, L., Miyata, G., Fetissof, S. O., Chen, C., . . . Laviano, A. (2004). Nicotine infusion into rat ventromedial nuclei and effects on monoaminergic system. *Neuroreport*, *15*(14), 2293-2297. doi:10.1097/00001756-200410050-00030
- Ravussin, Y., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2014). A missing link in body weight homeostasis: the catabolic signal of the overfed state. *Cell Metab*, *20*(4), 565-572. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.002
- Renshaw, G. M. (1994). [125I]-alpha-bungarotoxin binding co-varies with motoneurone density during apoptosis. *Neuroreport*, *5*(15), 1949-1952. doi:10.1097/00001756-199410000-00027
- Reseland, J. E., Mundal, H. H., Hollung, K., Haugen, F., Zahid, N., Anderssen, S. A., & Drevon, C. A. (2005). Cigarette smoking may reduce plasma leptin concentration via catecholamines. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, *73*(1), 43-49. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.006
- Rezai-Zadeh, K., Yu, S., Jiang, Y., Laque, A., Schwartzburg, C., Morrison, C. D., . . . Munzberg, H. (2014). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab*, *3*(7), 681-693. doi:10.1016/j.molmet.2014.07.008
- Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., . . . Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol*, *15*(10), 1748-1757. doi:10.1210/mend.15.10.0706
- Role, L. W., & Berg, D. K. (1996). Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron*, *16*(6), 1077-1085. doi:10.1016/s0896-6273(00)80134-8
- Romero-Pico, A., Sanchez-Rebordelo, E., Imbernon, M., Gonzalez-Touceda, D., Folgueira, C., Senra, A., . . . Dieguez, C. (2018). Melanin-Concentrating Hormone acts through hypothalamic kappa opioid system and p70S6K to stimulate acute food intake. *Neuropharmacology*, *130*, 62-70. doi:10.1016/j.neuropharm.2017.11.040
- Romero-Pico, A., Vazquez, M. J., Gonzalez-Touceda, D., Folgueira, C., Skibicka, K. P., Alvarez-Crespo, M., . . . Nogueiras, R. (2013). Hypothalamic kappa-opioid receptor modulates the orexigenic effect of ghrelin. *Neuropsychopharmacology*, *38*(7), 1296-1307. doi:10.1038/npp.2013.28
- Rothman, R. B., France, C. P., Bykov, V., De Costa, B. R., Jacobson, A. E., Woods, J. H., & Rice, K. C. (1989). Pharmacological activities of optically pure enantiomers of the kappa opioid agonist, U50,488, and its cis diastereomer: evidence for three kappa receptor subtypes. *Eur J Pharmacol*, *167*(3), 345-353. doi:10.1016/0014-2999(89)90443-3
- Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1979). A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis. *Nature*, *281*(5726), 31-35. doi:10.1038/281031a0

- Sahr, A. E., Sindelar, D. K., Alexander-Chacko, J. T., Eastwood, B. J., Mitch, C. H., & Statnick, M. A. (2008). Activation of mesolimbic dopamine neurons during novel and daily limited access to palatable food is blocked by the opioid antagonist LY255582. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(2), R463-471. doi:10.1152/ajpregu.00390.2007
- Sainsbury, A., Lin, S., McNamara, K., Slack, K., Enriquez, R., Lee, N. J., . . . Herzog, H. (2007). Dynorphin knockout reduces fat mass and increases weight loss during fasting in mice. *Mol Endocrinol*, 21(7), 1722-1735. doi:10.1210/me.2006-0367
- Saito, M., Minokoshi, Y., & Shimazu, T. (1987). Ventromedial hypothalamic stimulation accelerates norepinephrine turnover in brown adipose tissue of rats. *Life Sci*, 41(2), 193-197. doi:10.1016/0024-3205(87)90493-0
- Sajja, R. K., Rahman, S., & Cucullo, L. (2016). Drugs of abuse and blood-brain barrier endothelial dysfunction: A focus on the role of oxidative stress. *J Cereb Blood Flow Metab*, 36(3), 539-554. doi:10.1177/0271678X15616978
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., . . . Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(5), 1 page following 696. doi:10.1016/s0092-8674(02)09256-5
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799-806. doi:10.1038/414799a
- Saltiel, A. R., & Pessin, J. E. (2002). Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol*, 12(2), 65-71. doi:10.1016/s0962-8924(01)02207-3
- Salud, O. M. d. l. (2013). *Spain. Nutrition, physical activity and obesity*. Retrieved from http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/243326/Spain-WHO-Country-Profile.pdf?ua=1
- Salud, O. M. d. l. (2017). 10 datos sobre la obesidad. Retrieved from <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/es/>
- Salud, O. M. d. l. (2018). Obesidad y Sobrepeso. Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocytes arise from multiple lineages that are heterogeneously and dynamically distributed. *Nat Commun*, 5, 4099. doi:10.1038/ncomms5099
- Saper, C. B., Chou, T. C., & Elmquist, J. K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron*, 36(2), 199-211. doi:10.1016/s0896-6273(02)00969-8
- Saper, C. B., & Lowell, B. B. (2014). The hypothalamus. *Curr Biol*, 24(23), R1111-1116. doi:10.1016/j.cub.2014.10.023
- Schechter, M. D., & Cook, P. G. (1976). Nicotine-induced weight loss in rats without an effect on appetite. *Eur J Pharmacol*, 38(1), 63-69. doi:10.1016/0014-2999(76)90201-6

- Schicker, K. W., Dorostkar, M. M., & Boehm, S. (2008). Modulation of transmitter release via presynaptic ligand-gated ion channels. *Curr Mol Pharmacol*, 1(2), 106-129. doi:10.2174/1874467210801020106
- Schneeberger, M., Gomis, R., & Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol*, 220(2), T25-46. doi:10.1530/JOE-13-0398
- Schraufnagel, D. E. (2015). Electronic Cigarettes: Vulnerability of Youth. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol*, 28(1), 2-6. doi:10.1089/ped.2015.0490
- Schraufnagel, D. E., Blasi, F., Drummond, M. B., Lam, D. C., Latif, E., Rosen, M. J., . . . Forum of International Respiratory, S. (2014). Electronic cigarettes. A position statement of the forum of international respiratory societies. *Am J Respir Crit Care Med*, 190(6), 611-618. doi:10.1164/rccm.201407-1198PP
- Schreiber, R., Diwoy, C., Schoiswohl, G., Feiler, U., Wongsiriroj, N., Abdellatif, M., . . . Zechner, R. (2017). Cold-Induced Thermogenesis Depends on ATGL-Mediated Lipolysis in Cardiac Muscle, but Not Brown Adipose Tissue. *Cell Metab*, 26(5), 753-763 e757. doi:10.1016/j.cmet.2017.09.004
- Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Woods, S. C., Weigle, D. S., Campfield, L. A., Burn, P., & Baskin, D. G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes*, 46(12), 2119-2123. doi:10.2337/diab.46.12.2119
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661-671. doi:10.1038/35007534
- Seale, P. (2010). Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. *Int J Obes (Lond)*, 34 Suppl 1, S17-22. doi:10.1038/ijo.2010.178
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., . . . Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961-967. doi:10.1038/nature07182
- Seale, P., Kajimura, S., & Spiegelman, B. M. (2009). Transcriptional control of brown adipocyte development and physiological function--of mice and men. *Genes Dev*, 23(7), 788-797. doi:10.1101/gad.1779209
- Segal, J. P., Stallings, N. R., Lee, C. E., Zhao, L., Socci, N., Viale, A., . . . Friedman, J. M. (2005). Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurosci*, 25(16), 4181-4188. doi:10.1523/JNEUROSCI.0158-05.2005
- Seguela, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J. A., & Patrick, J. W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci*, 13(2), 596-604. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678857>
- Sellayah, D., Bharaj, P., & Sikder, D. (2011). Orexin is required for brown adipose tissue development, differentiation, and function. *Cell Metab*, 14(4), 478-490. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.010

- Sellayah, D., & Sikder, D. (2012). Orexin receptor-1 mediates brown fat developmental differentiation. *Adipocyte*, *1*(1), 58-63. doi:10.4161/adip.18965
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, F., Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, *50*(2), 276-291. doi:10.1007/s12020-015-0658-y
- Seoane-Collazo, P., Liñares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Romero-Picó, A., Moreno-Navarrete, J. M., Martínez-Sánchez, N., Garrido-Gil, P., Iglesias-Rey, R., Morgan, D. A., , Tomasini, N., Andrew-Malone, S., Senra, A., Folgueira, C., Medina-Gómez, G., Sobrino, T., Labandeira-García, J. L., Nogueiras, R., Domingos, A. I., Fernández-Real, J. M., Rahmouni, K., Diéguez, C., & Lopez, M. (2019) Central Nicotine Induces Browning Through Hypothalamic κ Opioid Receptor. *Nat Commun*, *10*(1), published online. doi: 10.1038/s41467-019-12004-z
- Seoane-Collazo, P., Martinez de Morentin, P. B., Ferno, J., Dieguez, C., Nogueiras, R., & Lopez, M. (2014). Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology*, *155*(5), 1679-1689. doi:10.1210/en.2013-1839
- Seoane-Collazo, P., Roa, J., Rial-Pensado, E., Linares-Pose, L., Beiroa, D., Ruiz-Pino, F., . . . Lopez, M. (2018). SF1-Specific AMPKalpha1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*, *67*(11), 2213-2226. doi:10.2337/db17-1538
- Shabalina, I. G., Petrovic, N., de Jong, J. M., Kalinovich, A. V., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep*, *5*(5), 1196-1203. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.044
- Shan, T., Liang, X., Bi, P., Zhang, P., Liu, W., & Kuang, S. (2013). Distinct populations of adipogenic and myogenic Myf5-lineage progenitors in white adipose tissues. *J Lipid Res*, *54*(8), 2214-2224. doi:10.1194/jlr.M038711
- Shaw, W. N. (1993). Long-term treatment of obese Zucker rats with LY255582 and other appetite suppressants. *Pharmacol Biochem Behav*, *46*(3), 653-659. doi:10.1016/0091-3057(93)90557-a
- Shaw, W. N., Mitch, C. H., Leander, J. D., Mendelsohn, L. G., & Zimmerman, D. M. (1991). The effect of the opioid antagonist LY255582 on body weight of the obese Zucker rat. *Int J Obes*, *15*(6), 387-395. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1653188>
- Shi, Y. C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., . . . Lin, S. (2013). Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab*, *17*(2), 236-248. doi:10.1016/j.cmet.2013.01.006
- Shih, M. F., & Taberner, P. V. (1995). Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by beta 3-adrenoceptor agonists. *Biochem Pharmacol*, *50*(5), 601-608. doi:10.1016/0006-2952(95)00185-3
- Shimogawa, Y., Maekawa, F., & Yamanouchi, K. (2014). Unilateral lesion increases oestrogen receptor alpha expression in the intact side of the ventromedial hypothalamic nucleus in ovariectomised rats. *J Neuroendocrinol*, *26*(4), 258-266. doi:10.1111/jne.12149

- Shin, H., Ma, Y., Chanturiya, T., Cao, Q., Wang, Y., Kadegowda, A. K. G., . . . Yu, L. (2017). Lipolysis in Brown Adipocytes Is Not Essential for Cold-Induced Thermogenesis in Mice. *Cell Metab*, 26(5), 764-777 e765. doi:10.1016/j.cmet.2017.09.002
- Siegmund, B., Leitner, E., & Pfannhauser, W. (1999). Determination of the nicotine content of various edible nightshades (Solanaceae) and their products and estimation of the associated dietary nicotine intake. *J Agric Food Chem*, 47(8), 3113-3120. doi:10.1021/jf990089w
- Silva, J. E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*, 86(2), 435-464. doi:10.1152/physrev.00009.2005
- Simpson, K. A., Martin, N. M., & Bloom, S. R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53(2), 120-128. doi:10.1590/s0004-27302009000200002
- Sims, E. A., Danforth, E., Jr., Horton, E. S., Bray, G. A., Glennon, J. A., & Salans, L. B. (1973). Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog Horm Res*, 29, 457-496. doi:10.1016/b978-0-12-571129-6.50016-6
- Siqueira, L. M., Committee On Substance, U. S. E., & Prevention. (2017). Nicotine and Tobacco as Substances of Abuse in Children and Adolescents. *Pediatrics*, 139(1). doi:10.1542/peds.2016-3436
- Skibicka, K. P., & Grill, H. J. (2009). Hypothalamic and hindbrain melanocortin receptors contribute to the feeding, thermogenic, and cardiovascular action of melanocortins. *Endocrinology*, 150(12), 5351-5361. doi:10.1210/en.2009-0804
- Small, C. J., Liu, Y. L., Stanley, S. A., Connoley, I. P., Kennedy, A., Stock, M. J., & Bloom, S. R. (2003). Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 27(4), 530-533. doi:10.1038/sj.ijo.0802253
- Song, C. K., Vaughan, C. H., Keen-Rhinehart, E., Harris, R. B., Richard, D., & Bartness, T. J. (2008). 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(2), R417-428. doi:10.1152/ajpregu.00174.2008
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531-543. doi:10.1016/s0092-8674(01)00240-9
- Spiegelman, B. M., Puigserver, P., & Wu, Z. (2000). Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 4, S8-10. doi:10.1038/sj.ijo.0801492
- Stanley, B. G., Urstadt, K. R., Charles, J. R., & Kee, T. (2011). Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiol Behav*, 104(1), 40-46. doi:10.1016/j.physbeh.2011.04.046
- Stanley, S., Pinto, S., Segal, J., Perez, C. A., Viale, A., DeFalco, J., . . . Friedman, J. M. (2010). Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(15), 7024-7029. doi:10.1073/pnas.1002790107

- Statnick, M. A., Tinsley, F. C., Eastwood, B. J., Suter, T. M., Mitch, C. H., & Heiman, M. L. (2003). Peptides that regulate food intake: antagonism of opioid receptors reduces body fat in obese rats by decreasing food intake and stimulating lipid utilization. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *284*(6), R1399-1408. doi:10.1152/ajpregu.00632.2002
- Stepanski, A. L. N. O. R. L. H. E. J. (2005). *JMP for Basic Univariate and Multivariate Statistics: A Step-by-step Guide*.
- Stolerman, I. P., & Jarvis, M. J. (1995). The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology (Berl)*, *117*(1), 2-10; discussion 14-20. doi:10.1007/bf02245088
- Sutton, A. K., Myers, M. G., Jr., & Olson, D. P. (2016). The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu Rev Physiol*, *78*, 207-221. doi:10.1146/annurev-physiol-021115-105347
- Sutton, A. K., Pei, H., Burnett, K. H., Myers, M. G., Jr., Rhodes, C. J., & Olson, D. P. (2014). Control of food intake and energy expenditure by Nos1 neurons of the paraventricular hypothalamus. *J Neurosci*, *34*(46), 15306-15318. doi:10.1523/JNEUROSCI.0226-14.2014
- Swan, G. E., Benowitz, N. L., Lessov, C. N., Jacob, P., 3rd, Tyndale, R. F., & Wilhelmsen, K. (2005). Nicotine metabolism: the impact of CYP2A6 on estimates of additive genetic influence. *Pharmacogenet Genomics*, *15*(2), 115-125. doi:10.1097/01213011-200502000-00007
- Sztalryd, C., Hamilton, J., Horwitz, B. A., Johnson, P., & Kraemer, F. B. (1996). Alterations of lipolysis and lipoprotein lipase in chronically nicotine-treated rats. *Am J Physiol*, *270*(2 Pt 1), E215-223. doi:10.1152/ajpendo.1996.270.2.E215
- Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., & Rahmouni, K. (2013). Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PLoS One*, *8*(2), e56660. doi:10.1371/journal.pone.0056660
- Teske, J. A., Levine, A. S., Kuskowski, M., Levine, J. A., & Kotz, C. M. (2006). Elevated hypothalamic orexin signaling, sensitivity to orexin A, and spontaneous physical activity in obesity-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *291*(4), R889-899. doi:10.1152/ajpregu.00536.2005
- Thim, L., Kristensen, P., Larsen, P. J., & Wulff, B. S. (1998). CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol*, *30*(12), 1281-1284. doi:10.1016/s1357-2725(98)00110-1
- Thompson, R. H., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol*, *376*(1), 143-173. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961202)376:1<143::AID-CNE9>3.0.CO;2-3
- Timmons, J. A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T. B., Lassmann, T., Petrovic, N., . . . Cannon, B. (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(11), 4401-4406. doi:10.1073/pnas.0610615104
- Tiraby, C., Tavernier, G., Lefort, C., Larrouy, D., Bouillaud, F., Ricquier, D., & Langin, D. (2003). Acquirement of brown fat cell features by human white adipocytes. *J Biol Chem*, *278*(35), 33370-33376. doi:10.1074/jbc.M305235200
- Tokunaga, K., Fukushima, M., Kemnitz, J. W., & Bray, G. A. (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol*, *251*(6 Pt 2), R1221-1227. doi:10.1152/ajpregu.1986.251.6.R1221

- Treinin, M., & Chalfie, M. (1995). A mutated acetylcholine receptor subunit causes neuronal degeneration in *C. elegans*. *Neuron*, *14*(4), 871-877. doi:10.1016/0896-6273(95)90231-7
- Tschop, M. H., Finan, B., Clemmensen, C., Gelfanov, V., Perez-Tilve, D., Muller, T. D., & DiMarchi, R. D. (2016). Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metab*, *24*(1), 51-62. doi:10.1016/j.cmet.2016.06.021
- Tseng, Y. H., Kokkotou, E., Schulz, T. J., Huang, T. L., Winnay, J. N., Taniguchi, C. M., . . . Kahn, C. R. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, *454*(7207), 1000-1004. doi:10.1038/nature07221
- Tupone, D., Madden, C. J., Cano, G., & Morrison, S. F. (2011). An orexinergic projection from perifornical hypothalamus to raphe pallidus increases rat brown adipose tissue thermogenesis. *J Neurosci*, *31*(44), 15944-15955. doi:10.1523/JNEUROSCI.3909-11.2011
- Tweed, J. O., Hsia, S. H., Lutfy, K., & Friedman, T. C. (2012). The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends Endocrinol Metab*, *23*(7), 334-342. doi:10.1016/j.tem.2012.03.006
- Uldry, M., Yang, W., St-Pierre, J., Lin, J., Seale, P., & Spiegelman, B. M. (2006). Complementary action of the PGC-1 coactivators in mitochondrial biogenesis and brown fat differentiation. *Cell Metab*, *3*(5), 333-341. doi:10.1016/j.cmet.2006.04.002
- University, K. S. SPSS Tutorials: Pearson Correlation. Retrieved from <https://libguides.library.kent.edu/SPSS/PearsonCorr>
- Uno, T., & Shibata, M. (2001). Role of inferior olive and thoracic IML neurons in nonshivering thermogenesis in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *280*(2), R536-546. doi:10.1152/ajpregu.2001.280.2.R536
- Usui, D., Yamaguchi-Shima, N., Okada, S., Shimizu, T., Wakiguchi, H., & Yokotani, K. (2009). Selective activation of the sympathetic ganglia by centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. *Auton Neurosci*, *146*(1-2), 111-114. doi:10.1016/j.autneu.2008.12.008
- Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., & Froguel, P. (1998). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet*, *20*(2), 113-114. doi:10.1038/2407
- van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M., & Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci*, *7*(5), 493-494. doi:10.1038/nn1226
- van Marken Lichtenbelt, W. D., & Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *301*(2), R285-296. doi:10.1152/ajpregu.00652.2010
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., . . . Teule, G. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med*, *360*(15), 1500-1508. doi:10.1056/NEJMoa0808718
- Villarroya, F., & Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab*, *17*(5), 638-643. doi:10.1016/j.cmet.2013.02.020

- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., . . . Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med*, *360*(15), 1518-1525. doi:10.1056/NEJMoa0808949
- Volkow, N. D. (2011). Epigenetics of nicotine: another nail in the coughing. *Sci Transl Med*, *3*(107), 107ps143. doi:10.1126/scitranslmed.3003278
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J., & Swanson, L. W. (1989). Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol*, *284*(2), 314-335. doi:10.1002/cne.902840212
- Wadgave, U., & Nagesh, L. (2016). Nicotine Replacement Therapy: An Overview. *Int J Health Sci (Qassim)*, *10*(3), 425-435. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27610066>
- Wager-Srdar, S. A., Levine, A. S., Morley, J. E., Hoidal, J. R., & Niewoehner, D. E. (1984). Effects of cigarette smoke and nicotine on feeding and energy. *Physiol Behav*, *32*(3), 389-395. doi:10.1016/0031-9384(84)90252-x
- Walden, T. B., Hansen, I. R., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2012). Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *302*(1), E19-31. doi:10.1152/ajpendo.00249.2011
- Waldhoer, M., Bartlett, S. E., & Whistler, J. L. (2004). Opioid receptors. *Annu Rev Biochem*, *73*, 953-990. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073940
- Wang, C., Billington, C. J., Levine, A. S., & Kotz, C. M. (2000). Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport*, *11*(14), 3251-3255. doi:10.1097/00001756-200009280-00040
- Wang, C., Bomberg, E., Billington, C., Levine, A., & Kotz, C. M. (2007). Brain-derived neurotrophic factor in the hypothalamic paraventricular nucleus increases energy expenditure by elevating metabolic rate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *293*(3), R992-1002. doi:10.1152/ajpregu.00516.2006
- Wang, J., Osaka, T., & Inoue, S. (2001). Energy expenditure by intracerebroventricular administration of orexin to anesthetized rats. *Neurosci Lett*, *315*(1-2), 49-52. doi:10.1016/s0304-3940(01)02322-9
- Wang, Y. H., Sun, J. F., Tao, Y. M., Chi, Z. Q., & Liu, J. G. (2010). The role of kappa-opioid receptor activation in mediating antinociception and addiction. *Acta Pharmacol Sin*, *31*(9), 1065-1070. doi:10.1038/aps.2010.138
- Weber, M., Motin, L., Gaul, S., Beker, F., Fink, R. H., & Adams, D. J. (2005). Intravenous anaesthetics inhibit nicotinic acetylcholine receptor-mediated currents and Ca²⁺ transients in rat intracardiac ganglion neurons. *Br J Pharmacol*, *144*(1), 98-107. doi:10.1038/sj.bjp.0705942
- Wellman, P. J., Bellinger, L. L., Cepeda-Benito, A., Susabda, A., Ho, D. H., & Davis, K. W. (2005). Meal patterns and body weight after nicotine in male rats as a function of chow or high-fat diet. *Pharmacol Biochem Behav*, *82*(4), 627-634. doi:10.1016/j.pbb.2005.11.002

- Whittle, A. J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M. J., . . . Vidal-Puig, A. (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell*, *149*(4), 871-885. doi:10.1016/j.cell.2012.02.066
- Whittle, A. J., Lopez, M., & Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med*, *17*(8), 405-411. doi:10.1016/j.molmed.2011.04.001
- Willi, C., Bodenmann, P., Ghali, W. A., Faris, P. D., & Cornuz, J. (2007). Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, *298*(22), 2654-2664. doi:10.1001/jama.298.22.2654
- Williams, G., Bing, C., Cai, X. J., Harrold, J. A., King, P. J., & Liu, X. H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*, *74*(4-5), 683-701. doi:10.1016/s0031-9384(01)00612-6
- Williams, K. W., Margatho, L. O., Lee, C. E., Choi, M., Lee, S., Scott, M. M., . . . Elmquist, J. K. (2010). Segregation of acute leptin and insulin effects in distinct populations of arcuate proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci*, *30*(7), 2472-2479. doi:10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010
- Williams, L. M. (2012). Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*, *71*(4), 521-533. doi:10.1017/S002966511200078X
- Wong, D., & Ogle, C. W. (1995). The contrasting influence of chronic nicotine intake on gastrin and gastric acid secretion. *J Gastroenterol Hepatol*, *10*(5), 577-584. doi:10.1111/j.1440-1746.1995.tb01349.x
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., . . . Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, *150*(2), 366-376. doi:10.1016/j.cell.2012.05.016
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., . . . Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, *98*(1), 115-124. doi:10.1016/S0092-8674(00)80611-X
- Xiu, X., Puskar, N. L., Shanata, J. A., Lester, H. A., & Dougherty, D. A. (2009). Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation-pi interaction. *Nature*, *458*(7237), 534-537. doi:10.1038/nature07768
- Xu, B., Goulding, E. H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R. D., Jones, K. R., . . . Reichardt, L. F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*, *6*(7), 736-742. doi:10.1038/nn1073
- Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y., & Tominaga, M. (2010). Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci*, *30*(38), 12642-12652. doi:10.1523/JNEUROSCI.2120-10.2010
- Yang, L., Scott, K. A., Hyun, J., Tamashiro, K. L., Tray, N., Moran, T. H., & Bi, S. (2009). Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci*, *29*(1), 179-190. doi:10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009

- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med*, *5*(9), 1066-1070. doi:10.1038/12506
- Yeo, G. S., & Heisler, L. K. (2012). Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat Neurosci*, *15*(10), 1343-1349. doi:10.1038/nn.3211
- Yeomans, M. R., & Gray, R. W. (2002). Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*, *26*(6), 713-728. doi:10.1016/s0149-7634(02)00041-6
- Yoshida, T., & Bray, G. A. (1984). Catecholamine turnover in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Am J Physiol*, *246*(4 Pt 2), R558-565. doi:10.1152/ajpregu.1984.246.4.R558
- Yoshida, T., Sakane, N., Umekawa, T., Kogure, A., Kondo, M., Kumamoto, K., . . . Saito, M. (1999). Nicotine induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of obese mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *23*(6), 570-575. doi:10.1038/sj.ijo.0800870
- Yoshida, T., Sakane, N., Umekawa, T., & Kondo, M. (1994). Effect of nicotine on sympathetic nervous system activity of mice subjected to immobilization stress. *Physiol Behav*, *55*(1), 53-57. doi:10.1016/0031-9384(94)90009-4
- Yoshikawa, H., Hellstrom-Lindahl, E., & Grill, V. (2005). Evidence for functional nicotinic receptors on pancreatic beta cells. *Metabolism*, *54*(2), 247-254. doi:10.1016/j.metabol.2004.08.020
- Yoshimichi, G., Yoshimatsu, H., Masaki, T., & Sakata, T. (2001). Orexin-A regulates body temperature in coordination with arousal status. *Exp Biol Med (Maywood)*, *226*(5), 468-476. doi:10.1177/153537020122600513
- Zeng, W., Pirzgalska, R. M., Pereira, M. M., Kubasova, N., Barateiro, A., Seixas, E., . . . Domingos, A. I. (2015). Sympathetic neuro-adipose connections mediate leptin-driven lipolysis. *Cell*, *163*(1), 84-94. doi:10.1016/j.cell.2015.08.055
- Zhan, C., Zhou, J., Feng, Q., Zhang, J. E., Lin, S., Bao, J., . . . Luo, M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci*, *33*(8), 3624-3632. doi:10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, *372*(6505), 425-432. doi:10.1038/372425a0
- Zhang, Z., Zhao, Z., Margolskee, R., & Liman, E. (2007). The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells. *J Neurosci*, *27*(21), 5777-5786. doi:10.1523/JNEUROSCI.4973-06.2007
- Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., . . . Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J*, *23*(9), 3113-3120. doi:10.1096/fj.09-133546

Ziouzenkova, O., & Plutzky, J. (2008). Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett*, 582(1), 32-38. doi:10.1016/j.febslet.2007.11.081





ANEXO 1

Lista licencias imágenes introducción:

Imagen	Nº de Licencia
Imagen 5. Distribución de los distintos núcleos hipotalámicos. (Saper & Lowell, 2014)	4275460 231667
Imagen 6. Circuitos hipotalámicos que regulan la termogénesis del BAT y el <i>browning</i> del WAT. (Contreras, Nogueiras, et al., 2017)	4276071 175992





