



TESE DE DOUTORAMENTO

**PAPEL DE MKK6 EN LA  
REGULACIÓN DE LA  
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA  
POR LAS HORMONAS  
TIROIDEAS**

Eva Rial Pensado

ESCOLA DE DOUTORAMENTO INTERNACIONAL DA UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN ENDOCRINOLOXÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

ANO 2021





## DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

**Papel de MKK6 en la regulación de la homeostasis energética por  
las hormonas tiroideas**

D./Dña. Eva Rial Pensado

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

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

*En Santiago de Compostela., ... de ..... de 2021.*

Fdo. Eva Rial Pensado







## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

**Papel de MKK6 en la regulación de la homeostasis energética por la  
hormonas tiroideas**

D. Miguel Antonio López Pérez  
D. Carlos Diéguez González

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D/Dña. **Eva Rial Pensado**, 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, ... de ..... de 2021*

Fdo. D. Miguel Antonio López Pérez

Fdo. D. Carlos Diéguez González





## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESE

### **Papel de MKK6 en la regulación de la homeostasis energética por las hormonas tiroideas**

D./Dña. Eva Rial Pensado

*Declaro non ter ningún conflito de interese en relación coa tese de doutoramento.  
Para que así conste, firmo o presente documento:*

*A 10 de Maio de 2021 en Santiago de Compostela,*



## Resumo

Dende 1975, a obesidade case se triplicou en todo o mundo. Segundo a OMS, o sobrepeso e a obesidade defínense como unha acumulación anormal ou excesiva de graxa que pode ser prexudicial para a saúde. En bioloxía, a homeostase enerxética é un proceso mediante o cal se mantén un equilibrio entre a enerxía inxerida e a enerxía consumida, o que resulta nunha variación da masa corporal. Tendo isto en conta, os individuos que amosan un peso estable, espérase que gasten a enerxía a un ritmo constante dependendo do seu tamaño corporal, nembargantes, perturbar este equilibrio enerxético para elevar ou diminuír o peso corporal, provocará que o gasto aumente ou diminúa a un ritmo máis acelerado do esperado.

O sistema nervioso central recibe os sinais periféricos de todos os procesos implicados na inxesta. As primeiras hipóteses sobre o control da inxesta estaban baseadas nun goberno dual dende o hipotálamo. Os dous centros principais implicados, serían o área lateral do hipotálamo e o núcleo ventromedial do hipotálamo, partícipes na promoción da inxesta e a saciedade respectivamente. Os órganos periféricos como o intestino, o tecido adiposo branco, a tiroides, o músculo e as gónadas producen sinais periféricos que informan os centros cerebrais do estado nutricional así como do metabólico. O cerebro procesa esa información e modula a inxesta e o gasto enerxético de acordo á demanda do organismo. Outro tecido implicado no metabolismo da homeostasis enerxética é, como xa se mencionou, o tecido adiposo branco. Orixinalmente considerábase un tecido pouco relevante dende o punto de vista hormonal, pero actualmente está claro que é un órgano endocrino. A principal hormona que cambiou a forma en que se concibía ao tecido adiposo branco, foi a leptina. O control da homeostase prodúcese no sistema nervioso central, sendo o hipotálamo o maior implicado, xa que a maioría dos sinais sensoriais e nutricionais chegan a este centro para proporcionar información sobre o estado nutricional do organismo. Está composto de diferentes poboacións neuronais que se atopan distribuídas en núcleos interconectados co resto de rexións cerebrais. O hipotálamo localízase debaixo do tálamo, constituíndo a maior parte do diencéfalo ventral. A información recibida polo hipotálamo, polo tanto, é integrada para emitir unha resposta a través da regulación da inxesta ou o gasto energético. A regulación da homeostase enerxética prodúcese dende o hipotálamo a través do sistema nervioso autónomo coa activación do sistema nervioso simpático. Esta ruta tamén afecta á termoxénese, xa que o tecido adiposo pardo (BAT) vese inervado directamente polo sistema nervioso simpático. O núcleo arcuato é un dos núcleos máis importantes na regulación da inxesta, está situado xusto encima da eminencia media, onde a barreira hematoencefálica. O núcleo ventromedial, é o primeiro núcleo que se considerou con influencia no balance enerxético e a regulación da masa corporal. Á parte desta función coñécense tamén outras nas cales intervén, como poden ser o comportamento sexual feminino ou a función cardiovascular. O rol do núcleo ventromedial do hipotálamo tamén se relacionou coa integración de sinais periféricos para regular a resposta termoxénica do tecido adiposo pardo e do tecido adiposo branco. Ao estimular o núcleo ventromedial do hipotálamo, aumenta a temperatura do tecido adiposo pardo, o que se reverte eliminando a función dos receptores  $\beta$ -adrenérxicos. Moitos son os sinais periféricos que estimulan a termoxénese a través do núcleo ventromedial, como as hormonas tiroideas. Principalmente a acción destas substancias prodúcese a través da inhibición da proteína quinasa activada polo adenosín monofosfato (AMPK), que leva á activación das fibras nerviosas simpáticas que inervan o tecido adiposo pardo e branco, o que conformaría un eixo a través do cal se dá a termoxénese. O núcleo paraventricular do hipotálamo sitúase a ambos os dous lados do terceiro ventrículo na parte superior do hipotálamo anterior. Considérase un núcleo integrador, xa que recibe numerosas proxeccións doutras zonas cerebrais, regulando

así o balance enerxético. As principais áreas das que recibe esas proxeccións neuronais son outros núcleos hipotalámicos, o tronco cerebral, o hipocampo ou sinais sensoriais indicadoras do estado do organismo. A área lateral do hipotálamo atópase como parte esencial na regulación da inxesta e o balance enerxético. Lesións nesta zona resultan en complicacións na alimentación, provocando unha ausencia total en ocasións. O balance de enerxía dun individuo mantense a partir dun equilibrio entre a inxesta e o gasto enerxético.

No gasto enerxético un dos factores para ter en conta é a termoxénese, que se podería definir como a produción de calor non relacionada coa actividade física. A termoxénese é un proceso fundamental para o mantemento da temperatura nos animais homeotermos. Este proceso prodúcese esencialmente no tecido adiposo pardo, un tecido cuxa especialización é principalmente producir calor, e en mamíferos de pequeno tamaño é importante xa que lles permite xerar calor independentemente dos músculos, a través do cal xerarían calor mediante a termoxénese por tremor. Ao principio ese tecido críase que se atopaba en animais, principalmente roedores e hibernantes, e en humanos recentemente nados, pero nos últimos anos, mediante tomografía por emisión de positróns- tomografía computerizada, descubriuse tamén a súa presenza en humanos adultos. En particular, os adipocitos marróns teñen unha forma poligonal con numerosas pingas lipídicas multiloculares, ademais dun gran número de mitocondrias e atópase fortemente innervado por fibras de tipo simpático. O tecido adiposo branco, doutra banda, é a principal fonte de reserva de graxa no corpo, os adipocitos posúen só unha pinga lipídica unilocular que permite o almacenamento da graxa. Cabe destacar do tecido adiposo pardo tamén, que se atopa fortemente vascularizado para que cando se xere a calor resultante da termoxénese, se distribúa facilmente. A termoxénese ten lugar a través do desacoplamento do adenosín trifosfato, producido a partir da respiración mitocondrial. Ese desacoplamento, atópase mediado pola proteína desacoplante 1 (UCP1), que se atopa na membrana interna da mitocondria. A función do tecido adiposo pardo está controlada tanto de forma central como periférica. O sistema nervioso simpático é esencial para activar a termoxénese no tecido adiposo pardo. Un incremento na estimulación dos nervios que innervan o tecido adiposo pardo, conleva a unha liberación de noradrenalina nas terminacións nerviosas e conseguinte activación dos receptores  $\beta$ - adrenérxicos expresados no tecido adiposo pardo, principalmente o subtipo  $\beta_3$ .

As hormonas tiroideas son esenciais para o crecemento e desenvolvemento de todos os vertebrados. A súa síntese e secreción está modulada polo eixo hipotálamo- hipófisis- tiroides. É sabido que a produción das hormonas tiroideas está gobernado por un mecanismo central que comeza no hipotálamo paraventricular, segue na hipófisis e acaba na tiroides. As hormonas tiroideas circulantes regulan os compoñentes centrais mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. A glándula tiroides produce na súa gran maioría tiroxina ou T4, que ten baixa actividade biolóxica, pero é a que maiormente se localiza en sangue e é precursora da triyodotironina ou T3, que se produce ao eliminar unha molécula do anel fenólico exterior, aumentando a actividade desta hormona. As hormonas tiroideas incrementan a taxa metabólica basal do organismo, faise evidente a súa importancia na homeostasis enerxética naqueles casos clínicos con desordes tiroideos. Moitos casos de hipotiroidismo danse en pacientes obesos, suxerindo un papel fundamental destas hormonas neste tipo de patoloxías. No que se refire ao seu papel á termoxénese, o tecido adiposo pardo é unha das dianas directas das hormonas tiroideas, xa que ten un alto nivel de expresión dos seus receptores, de forma que ditas hormonas actúan de forma sinérgica xunto coa norepinefrina para xerar unha resposta termoxénica completa. A quinasa activada por adenosín monofosfato é unha proteína que se incrementa en resposta a alteracións nos

nucleótidos de adenina, especificamente, unha redución do adenosín trifosfato e unha elevación en adenosín monofosfato e adenosín difosfato. Unha vez activada, esta quinasa modula o metabolismo a través da fosforilación de proteínas chave e factores de transcrición que promoven vías catabólicas, mentres que por outra banda inhibe aquelas anabólicas. Coa inxección central de T3 no núcleo ventromedial do hipotálamo, púidose inducir un aumento na actividade termoxénica, asociado esto cunha diminución da fosforilación da quinasa activada por adenosín monofosfato no núcleo ventromedial do hipotálamo. Isto tamén se atopa acompañado dun aumento da sinalización simpática cara o tecido adiposo pardo. As rutas metabólicas detrás destes efectos, son o estrés do retículo endoplásmico provocado polas ceramidas e a activación da quinasa c-Jun N-terminal 1. Demostrouse que a mencionada quinasa no hipotálamo está implicada na regulación do balance enerxético e tamén a nivel da inxesta.

As proteínas quinasas activadas por mitóxeno (MAPK) son serín treonin proteín quinasas que se activan en resposta a estímulos de estrés extracelular. Unha vez activadas, estas quinasas, que se expresan de maneira ubicua, fosforilan un amplo rango de proteínas augas abaixo. No que se refire ao tecido adiposo, as quinasas activadas por estrés xogan un papel bastante importante. Nos adultos, o número de adipocitos permanece constante, pero a obesidade provoca que o tecido adiposo se expanda. Os procesos mediante os cales isto pode ocorrer, son a hipertrofia das células adiposas mediante o almacenamento de ácidos graxos, e tamén a diferenciación de células precursoras cara a adipocitos, tamén chamado adipoxénese. O módulo das quinasas activadas por estrés p38 foi proposto como un regulador da adipoxénese. Sábese que estimula os estádios máis temperáns dos fibroblastos para que se diferencien en adipocitos, con todo, a activación de p38 en estados máis tardíos da adipoxénese, viuse que promove a apoptose. No que se refire ao tecido adiposo pardo, a vía de p38 tamén forma parte da regulación da termoxénese e browning. No tecido adiposo branco, p38 $\alpha$  vese activado por unha ruta alternativa que involucra a quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) e a quinasa activada polo factor de crecemento transformante  $\beta$  1 (TAK1). A activación de p38 $\alpha$  aumenta o browning baixo os efectos da T3, e a consecuente expresión da proteína desacoplante 1. Podería entón considerarse como unha diana terapéutica no tratamento da obesidade. Estudos en humanos, correlacionanse con estes achados, xa que se viu unha relación dunha quinasa activada por estrés (MKK6) coa expresión da proteína desacoplante 1 no tecido adiposo branco, que se correlaciona de forma inversa co índice de masa corporal.

Para determinar o efecto da inhibición de MKK6 no VMH, os ratos foron divididos en 2 grupos de 10 animais cada un, con acceso libre a comida estándar, un grupo foi inoculado con adenovirus asociados que expresan a recombinasa CRE e o outro con GFP ou grupo control no ventromedial. Transcorridas 4 semanas, procedeuse a realizar ensaios de tolerancia a glicosa e insulina, monitorizouse a temperatura corporal e obtivéronse imaxes do tecido adiposo pardo. Seguidamente, substituíuse a comida estándar por comida alta en graxas. Trancorridas 6 semanas fixéronse de novo ensaios de tolerancia a glicosa, insulina, toma de imaxes termográficas do BAT e temperatura rectal. Durante a última semana, introducíronse os animais en caixas metabólicas para monitorar o gasto enerxético, o cociente respiratorio e a actividade locomotora. Para determinar se a inhibición de MKK6 no VMH en condicións de dieta alta en graxas afectaba á sinalización por hormonas tiroideas, os animais foron divididos en 4 grupos de 10 animais cada un, con acceso libre a comida alta en graxas. Dous grupos foron inoculados con adenovirus asociados que expresan a recombinasa CRE e os outros con GFP como control, no ventromedial. Transcorridas 4 semanas, procedeuse a realizar unha



canulación intracerebroventricular para inocular T3 nunha dose de 8 ng unha vez ao día durante 5 días. Os animais deixáronse en recuperación durante 2 ou 3 días. Para a medición do gasto enerxético, o cociente respiratorio e a actividade locomotora, introducíronse en caixas metabólicas. Previo á finalización do experimento procedeuse á toma de imaxes termográficas do BAT e temperatura corporal.

Unha vez obtidos os resultados in vivo da inhibición de MKK6 no VMH, analizouse a expresión de MKK6 e de pp38 para comprobar se se atopaban reducidos. Os resultados indicaron uns niveis significativamente máis baixos de MKK6 e de pp38 $\alpha$ . A inhibición virogenética de MKK6, non induciu cambios diferenciais na masa corporal ou a inxesta dos animais tratados fronte aos seus controis, nin en dieta estándar nin alta en graxas, o que nos indicou que a inhibición na expresión de MKK6 non era relevante na variación de peso corporal nin a inxesta nas condicións descritas. En vista dos resultados anteriores e para completar o fenotipado metabólico dos animais, comprobouse o estado do gasto enerxético nos dous grupos con dieta alta en graxas. Os parámetros analizados foron o gasto enerxético, a actividade locomotora e o cociente respiratorio. Os datos non amosaron ningún cambio dos animais tratados coa recombinasa fronte aos seus controis GFP. Análises máis exhaustivas, indicaron que a inhibición de MKK6 no ventromedial non induciu cambios nos ratos alimentados con dieta estándar na función do tecido adiposo pardo. Tampouco se observaron diferenzas no que se refire á temperatura corporal. Tamén se analizou a función termoxénica nos animais alimentados con alta en graxas, pero tampouco se viron cambios significativos. Para investigar se a inhibición no ventromedial de MKK6 afectaba á acción das hormonas tiroideas, tal e como se describe en estudos recentes, tratamos ratos MKK6 flox con adenovirus asociados que expresaban a recombinasa CRE e GFP. Estes animais foron alimentados con dieta estándar e alta en graxas ad libitum. Ao pasar 4 semanas, administróuselles T3 intracerebroventricularmente durante 5 días. Os resultados obtidos, amosaron que, nos animais control, a administración central de T3 mantiña os efectos esperados sobre o peso corporal e a inxesta nos animais con dieta estándar. Este feito, indicounos que en condicións de dieta estándar a falta de MKK6 non foi esencial para o efecto central das hormonas tiroideas. En condicións de dieta alta en graxas, atopamos unha diminución da masa corporal nos animais controis con T3, o cal tamén nos sinalou que en están condicións as hormonas tiroideas centralmente manteñan os seus efectos. Os datos obtidos nos animais tratados con adenovirus codificantes de CRE, non indicaron variacións significativas nin no peso corporal nin na inxesta. En conxunto, estes datos amosaronnos que, en condicións de obesidade inducida por dieta, MKK6 tiña un papel importante na sinalización das hormonas tiroideas no ventromedial. No noso modelo, os animais control tratados con T3 tiveron un aumento da temperatura na área do BAT, así como un marcado incremento da temperatura corporal. Por tanto, a inhibición de MKK6 no VMH tamén afectou á capacidade termoxénica do BAT, interferindo a súa falta na sinalización inducida polas hormonas tiroideas. Debido a estes resultados, o seguinte paso foi estudar o efecto da eliminación de MKK6 no VMH sobre o browning do tecido adiposo branco. Os datos dos controis con T3, non amosaron un aumento dos marcadores termogénicos en graxa branca gonadal, nin no caso de animais tratados con AAV de GFP nin de CRE. Aínda que evidencias do noso grupo sí que documentaron aumento do browning debido á acción central das hormonas tiroideas, este efecto neste caso podería estar enmascarado pola comida alta en graxas. No animais control, víronse diferenzas na expresión de pMKK3/ pMKK6 e pp38 $\alpha$ , ambas as disminuídas no grupo GFP T3 ICV, non se observaron cambios nos niveis do resto das proteínas da ruta. Trala microinxestión de adenovirus codificantes de CRE no ventromedial, observouse que pMKK3/ pMKK6 e pp38 $\alpha$  aumentaban a súa expresión, sen



alterar de novo ningunha das outras proteínas da vía. Polo que, as hormonas tiroideas no ventromedial afectaban á fosforilación de MKK3, MKK6 e p38 $\alpha$ . Con todo, ao inxectar T3 central en ratos control, observouse unha diminución no ventromedial dos niveis proteicos de pAMPK $\alpha$  da ruta de AMPK. Nos animais tratados con adenovirus coficientes de CRE, pola contra, non se viron variacións ao inxectar T3, en concordancia cos datos sobre termoxénese, xa que unha diminución en AMPK activa o tecido adiposo pardo a través do sistema nervioso simpático. En relación cos datos anteriores, analizáronse os niveis das principais proteínas implicadas na tensión do ER. Os resultados nos animais tratados con GFP e T3 ICV amosaron unha diminución significativa da vía, con todo, nos animais tratados con AVVs codificantes de CRE, non se viron variacións significativas na ruta de estrés do ER. Estes datos amósannos que a inhibición de MKK6 no VMH estaría a afectar tamén á sinalización por hormonas tiroideas sobre a vía do estrés do ER.

O hipertiroidismo é unha síndrome que provoca un aumento na secreción das hormonas tiroideas circulantes pola glándula tiroides. Os pacientes con tirotoxicosis xeralmente mostran perda de peso, aínda que a maioría deles sofren un aumento na inxesta. Con todo, o hipotiroidismo está asociado cun descenso do gasto enerxético e un aumento de peso corporal, aínda que os pacientes exhiban unha inxesta reducida. Existe unha incidencia do 20% de hipotiroidismo nos pacientes con obesidade, suxerindo un papel importante das hormonas tiroideas. A visión clásica atribúe un papel directo das hormonas tiroideas sobre o BAT, con todo estudos recentes, moitos deles do noso grupo, amosaron que a relación entre as hormonas tiroideas, o SNS e o BAT ten lugar a varios niveis, e que a acción destas hormonas pode producirse no hipotálamo, que sinalizaría ao BAT, en lugar de actuar directamente sobre os adipocitos marróns. Os datos obtidos mostran que a ablación de MKK6 por si soa non inflúe no metabolismo, aínda que trala administración central de T3, suprímense os efectos tanto termoxénicos no BAT e lipoxénicos no fígado esperados, o que suxire un papel de MKK6 no VMH para a acción das hormonas tiroideas. O feito de que non se vexan cambios na vía de AMPK nos grupos con redución na expresión de MKK6, indica que esta quinasa está a intervir dalgunha forma na actividade das hormonas tiroideas sobre AMPK, o que impide a activación do SNS e reduce a capacidade termoxénica do BAT e tamén a lipoxénese de novo no fígado. Doutra banda, suxírese que estes efectos débense principalmente á redución na activación da isoforma p38 $\alpha$ , polo que podería ter un papel central de gran importancia no metabolismo enerxético. Quedaría por determinar cal é a relación desta quinasa con AMPK. En estudos anteriores demostrouse que a vía que parece intervir nesta relación é a de TAK1 e TAB1, xa que estas son MAP3 quinases que promoven a activación tanto de MKK6 como de AMPK. Estes resultados contribúen ao estudo da familia das MAPK p38 no campo do metabolismo, e establecen por primeira vez a súa importancia a nivel central mediando o efecto das hormonas tiroideas sobre o gasto enerxético, a termoxénese e a lipoxénese hepática. **Palabras chave:** MKK6, BAT, hormonas tiroideas, hipotálamo.

### Resumen

La ganancia de peso corporal y la consecuencia más directa, la obesidad, es un factor de riesgo que lleva a enfermedades colaterales como pueden ser diabetes, problemas cardiovasculares o cáncer. Las hormonas tiroideas han demostrado tener una gran implicación en el gasto energético, así como en la ingesta, actuando principalmente de forma central. A nivel del hipotálamo, se ha demostrado que dichas hormonas tienen un papel fundamental sobre la termogénesis del tejido adiposo pardo (BAT, *Brown adipose tissue*) y sobre la lipogénesis hepática a través de la vía de las quinases c-jun N-terminal (JNK, *c-Jun N-*

*terminal kinases*). Otras rutas de las quinasas activadas por mitógeno, han demostrado ser de gran importancia también sobre la activación del BAT y del browning del tejido adiposo blanco. En concreto, datos previos han demostrado que MKK6 actúa sobre el gasto energético mediando la acción de las hormonas tiroideas de forma periférica. Debido a que la acción de dichas hormonas se ha descrito como muy importante a nivel hipotalámico, en este trabajo se estudió la influencia de MKK6 sobre la función tiroidea a nivel central. Nuestros datos muestran que en condiciones de obesidad inducida por dieta, la delección de MKK6 de forma central, impide la acción de las hormonas tiroideas sobre el BAT y el gasto energético. **Palabras clave:** MKK6, BAT, hormonas tiroideas, hipotálamo.

#### Abstract

Obesity, is a risk factor that leads to collateral diseases such as diabetes, cardiovascular diseases or cancer. Thyroid hormones have a great implication in energy expenditure, as well as in food intake, acting mainly centrally at hypothalamic level. These hormones play a critical role on the thermogenesis in brown adipose tissue (BAT) and on hepatic lipogenesis through the N-terminal c-jun kinase (JNK) pathway. Other mitogen-activated kinase pathways are also important in the activation of BAT and the browning of white adipose tissue. Previous data showed that MKK6 acts on energy expenditure by mediating the action of thyroid hormones at peripheral level. Since the action of these hormones has been described to be very important at the hypothalamic level, the influence of MKK6 on thyroid function at the central level was studied. Our data showed that in diet-induced obesity, deletion of MKK6 centrally prevents the action of thyroid hormones on BAT and energy expenditure. **Key words:** MKK6, BAT, thyroid hormones, hypothalamus.

# ÍNDICE





ÍNDICE .....	17
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	21
1 INTRODUCCIÓN .....	29
1.1 <i>Obesidad y homeostasis energética</i> .....	29
1.1.1 <i>Obesidad</i> .....	29
1.1.2 <i>Homeostasis energética</i> .....	29
1.2 <i>El hipotálamo y la regulación de la homeostasis energética</i> .....	32
1.2.1 <i>Núcleo Arcuato</i> .....	33
1.2.2 <i>Núcleo ventromedial</i> .....	34
1.2.3 <i>Núcleo Dorsomedial</i> .....	36
1.2.4 <i>Núcleo Paraventricular</i> .....	36
1.2.5 <i>Área hipotalámica lateral</i> .....	37
1.3 <i>El gasto energético y la termogénesis</i> .....	38
1.4 <i>Las hormonas tiroideas</i> .....	41
1.5 <i>Estrés del retículo endoplasmático</i> .....	46
1.6 <i>AMPK: el sensor energético</i> .....	49
1.7 <i>Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógeno</i> .....	52
1.7.1 <i>Módulo ERK 1/2</i> .....	52
1.7.2 <i>Módulo JNK</i> .....	53
1.7.3 <i>Módulo de p38</i> .....	54
2 HIPÓTESIS .....	59
3 OBJETIVOS .....	63
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
4.1 <i>Modelos animales</i> .....	67
4.1.1 <i>Legislación</i> .....	67
4.1.2 <i>Modelos animales</i> .....	67
4.2 <i>Anestesia y analgesia</i> .....	68
4.2.1 <i>Vías de administración de sustancias</i> .....	68
4.3 <i>Procedimientos no quirúrgicos</i> .....	69
4.3.1 <i>Monitorización de la ingesta y de la masa corporal</i> .....	69
4.3.2 <i>Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora</i> .....	70
4.3.3 <i>Determinación de la composición corporal</i> .....	70
4.3.4 <i>Test de tolerancia a glucosa e insulina</i> .....	70
4.4 <i>Procedimientos quirúrgicos</i> .....	70
4.4.1 <i>Canulación Intracerebroventricular</i> .....	70
4.4.2 <i>Estereotaxia núcleo-específica</i> .....	71
4.4.3 <i>Diseción y extracción de tejidos</i> .....	71
4.5 <i>Diseños experimentales</i> .....	72

4.5.1 Inoculación de Adenovirus Asociados Cre en ratones MKK6 FLOX con STD y HFD.....	72
4.5.2 Inoculación de Adenovirus Asociados Cre y T3 ICV en ratones MKK6 flox con HFD .....	73
4.6 Técnicas analíticas.....	73
4.6.1 Análisis de proteínas por western blot .....	73
4.7 Análisis de ARN mensajero por PCR en tiempo real .....	81
4.8 Tinción OIL-RED-O.....	83
4.9 Estadística .....	84
4.9.1 Test paramétricos .....	84
5 RESULTADOS.....	87
5.1 MKK6 en el VMH no afecta al balance energético.....	87
5.1.1 MKK6 en el VMH no afecta al peso, ingesta o gasto energético .....	88
5.1.2 MKK6 en el VMH no afecta a la termogénesis .....	90
5.2 MKK6 en VMH y la regulación de la glucemia .....	91
5.3 MKK6 no afecta a la lipogénesis hepática.....	93
5.4 La inhibición de MKK6 en el VMH regula los efectos centrales de las hormonas tiroideas.....	94
5.4.1 MKK6 en el VMH regula la acción de las THs sobre el peso corporal en HFD .....	94
5.4.2 MKK6 está implicada en la regulación del gasto energético por THs .....	97
5.4.3 MKK6 afecta a la capacidad termogénica del BAT.....	98
5.4.4 MKK6 no tiene efectos sobre el browning de mediado por hormonas tiroideas .....	101
5.5 La inhibición de MKK6 en el VMH regula los efectos de las hormonas tiroideas sobre las rutas de AMPK y estrés del RE .....	101
5.6 La inhibición de MKK6 en el VMH regula los efectos centrales de las hormonas tiroideas sobre el contenido lipídico hepático .....	105
6 DISCUSIÓN .....	111
7 CONCLUSIONES.....	117
8 BIBLIOGRAFÍA .....	121

# 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*.

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

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*.

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

CKK: colecistoquinina, *cholescistokinin*.

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

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

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

DV: dorsoventral.

EE: gasto energético, *energy expenditure*.

ER $\alpha$ : receptor de estrógenos alfa, *estrogen receptor alpha*.

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

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*.

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

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

ICH: inmunohistoquímica, *immunohistochemistry*.

ICV: intracerebroventricular.

IMC: índice de masa corporal.

IP: intraperitoneal.

IR: receptor de insulina, *insulin receptor*.

LA: actividad locomotora, *locomotor activity*.

LepR: receptor de leptina, *leptin receptors*.

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

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

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

NE: norepinefrina, *norepinephrine*.

NEFA: ácidos grasos libres no-esterificados, *nonesterified free fatty acids*.

NPY: neuropeptido Y, *neuropeptide Y*.

NPYR1-5: receptores de neuropeptido y 1-5, *neuropeptide Y receptors 1-5*.

OMS: organización mundial de la salud.

OX: orexina, *orexin*.

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*.

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

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

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

POA: área preóptica, *preoptic area*.

POMC: proopiomelanocortina, *proopiomelanocortin*.

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

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)<sub>3-36</sub>*.

RA- $\beta$ 3: receptores adrenérgicos  $\beta$ 3.

RE: retículo endoplásmico.

RQ: cociente respiratorio, *respiratory quotient*.

SC: subcutáneo.

STD: dieta estándar, *standard diet*.

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

SF1: factor esteroidogénico 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*.

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

TG: triacilglicerol, *triacilglycerol*.

TH: hormonas tiroideas

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

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

VMH: núcleo ventromedial, *ventromedial nucleus*.

WAT: tejido adiposo blanco.

## ANGLICISMOS

*Browning*: pardeamiento

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

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

*Knockout*: modificación genética en la cual se inactiva la expresión de un gen

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



# INTRODUCCIÓN





# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 OBESIDAD Y HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

### 1.1.1 Obesidad

Desde 1975, la obesidad se ha casi triplicado en todo el mundo. En 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos. En 2016, el 39% de las personas adultas de 18 o más años tenían sobrepeso, y el 13% eran obesas. La mayoría de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal (OMS, 2020).

Según la OMS, el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). En el caso de los adultos, la OMS define el sobrepeso y la obesidad como se indica a continuación:

Sobrepeso: IMC igual o superior a 25.

Obesidad: IMC igual o superior a 30.

El IMC proporciona la medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, pues es la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades. Sin embargo, hay que considerarla como un valor aproximado porque puede no corresponderse con el mismo nivel de adiposidad en diferentes personas. En el caso de los niños, es necesario tener en cuenta la edad al definir el sobrepeso y la obesidad. Un IMC elevado es un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles, Las enfermedades cardiovasculares (principalmente las cardiopatías y los accidentes cerebrovasculares), la diabetes, los trastornos del aparato locomotor (en especial la osteoartritis, una enfermedad degenerativa de las articulaciones muy discapacitante), y algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon). El riesgo de contraer estas enfermedades no transmisibles crece con el aumento del IMC (OMS, 2020).

Si bien el sobrepeso y la obesidad se consideraban antes un problema propio de los países de ingresos altos, ambos trastornos aumentan en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos. Actualmente, muchos países de ingresos bajos y medianos están afrontando una «doble carga» de morbilidad. Mientras estos países continúan encarando los problemas de las enfermedades infecciosas y la desnutrición, también experimentan un rápido aumento en los factores de riesgo de las enfermedades no transmisibles, como la obesidad y el sobrepeso, sobre todo en los entornos urbanos. No es raro encontrar la desnutrición y la obesidad coexistiendo (OMS, 2020).

### 1.1.2 Homeostasis energética

En biología, la homeostasis energética es un proceso mediante el cual se mantiene un equilibrio entre la energía ingerida y la energía consumida, lo que resulta en una variación de la masa corporal (Kleiber, 1947). La energía ingerida, viene dada por la ingesta, mientras que la energía consumida, se debe principalmente a la actividad física, la termogénesis y el metabolismo basal. Además de estos factores, otros como pueden ser la especie, la edad, el género sexual o el ambiente, también interfieren en esta homeostasis (Friedman, 2009). De esta forma, cuando este balance se ve alterado, pueden ocurrir dos situaciones dependiendo si es positivo o negativo. Un mayor gasto puede dar lugar a una masa corporal inferior a lo recomendado, y una mayor ingesta un aumento de esta masa, que en casos extremos, puede llegar a provocar obesidad (Leibel et al., 1995; Ravussin et al., 2014; Sims et al., 1973). Teniendo esto en cuenta, los individuos que muestran un peso estable, se espera que gasten la energía a un ritmo constante dependiendo de su tamaño corporal, sin embargo, perturbar este equilibrio energético para elevar o disminuir el peso corporal, provocará que el gasto aumente o disminuya a un ritmo más acelerado de lo esperado (Rothwell and Stock, 1982).

El sistema nervioso central recibe las señales periféricas de todos los procesos implicados en la ingesta. Las primeras hipótesis sobre el control de la ingesta estaban basadas en un gobierno dual desde el hipotálamo. Los dos centros principales implicados, serían el área lateral del hipotálamo (LHA, *lateral hypothalamic area*) y el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH, *ventromedial hypothalamous*), partícipes en la promoción de la ingesta y la saciedad respectivamente (Anand and Brobeck, 1951; Hetherington and Ranson, 1942). El conocimiento desde esas primeras observaciones ha avanzado, pero la premisa fundamental se sigue manteniendo, y es que se considera que las distintas áreas y núcleos hipotalámicos son las que regulan la ingesta, y el gasto de energía, la utilización y particionamiento de nutrientes, el metabolismo lipídico y la homeostasis de la glucosa (Williams, 2012).

Los órganos periféricos como el intestino, el tejido adiposo blanco, la tiroides, el músculo y las gónadas producen señales periféricas que informan a los centros cerebrales del estado nutricional así como del metabólico (Abizaid et al., 2006; Flier, 2004; Horvath et al., 2004). El cerebro procesa esa información y modula la ingesta y el gasto energético de acuerdo a la demanda del organismo. A nivel gastrointestinal, la coleocistoquinina (CKK, *cholecystokinin*), cuyos principales efectos son anorexigénicos, es secretada en el duodeno y el jejunio en respuesta a la ingesta de proteínas y ácidos grasos (Geary et al., 1996; Kissileff et al., 2003; Perez-Tilve et al., 2006). Otros péptidos también con implicaciones sobre la saciedad, son el péptido análogo de glucagón 1 (GLP-1, *glucagon-like peptide 1*) y la oxintomodulina (OXM, *oxyntomodulin*), liberados en respuesta a ácidos grasos no esterificados (NEFA, *non- esterified fatty acids*) y carbohidratos, ambos inhiben la ingesta cuando son administrados tanto periférica como centralmente (Dakin et al., 2004; Gonzalez-Garcia et al., 2019; Lopez et al., 2007b; Turton et al., 1996). El péptido YY (PYY, *peptide YY*) se secreta en estado postprandial, en las células L del tracto gastrointestinal, sobre todo en porciones distales como son el íleo, recto o colon, en dos formas PYY 1-36 y PYY 3-36. La administración periférica de PYY a través de los recetores Y1 y Y5 incrementa la ingesta, mientras que la forma 3-36 a través del receptor Y2, inhibe la ingesta. Esta isoforma es la que ha recibido más atención habiéndose descrito que reduce la ingesta y el aumento de peso corporal en humanos, primates y roedores (Batterham et al., 2002). Por último, en lo que se refiere a hormonas del tracto gastrointestinal, cabe destacar la ghrelina. Esta hormona se sintetiza y libera en las células oxínticas del *fundus* estomacal, el duodeno, el íleo, el ciego y el colon (Kageyama et al., 2010; Lopez et al., 2008), aunque también se ha demostrado su expresión en otros tejidos como pueden ser el hipotálamo, los testículos, la hipófisis o los



ovarios, entre otros (Caminos et al., 2003a; Caminos et al., 2003b; Tena-Sempere et al., 2002). Es una hormona que se encarga de regular el apetito y la homeostasis nutricional, cuyos niveles aumentan en ayuno e inducen el hambre. La administración de ghrelina, tanto sistémica como central, aumenta la adiposidad y la ingesta (Tschop et al., 2000). A pesar de que en general se considera que provoca la iniciación de la ingesta, y por lo tanto es una hormona orexigénica, numerosos estudios se han realizado para poder desentrañar su compleja acción en la regulación del hambre y el metabolismo (Cummings et al., 2004; Muller et al., 2015; Tschop et al., 2001). En el hipotálamo la ghrelina aumenta la liberación de endocannabinoides (Kola et al., 2008), lo que conlleva la activación de la proteína quinasa dependiente de calcio /calmodulina (CaMKK2, calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2) y de la proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK, AMP-activated protein kinase) dando lugar a la inactivación de la síntesis *de novo* de lípidos. Por otro lado, también provoca la regulación negativa de la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocito agonista del receptor 4 de melacortinas ( $\alpha$ -MSH, melacortin 4 receptor agonist  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone) y de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, mechanistic target of rapamycin) en el arcuato. Esta inhibición central de mTOR hace que decrezca la acción orexigénica de la ghrelina (Kola et al., 2005; Kwon Jeong et al., 2013; Lage et al., 2010; Martins et al., 2012). En humanos, la ghrelina está asociada de forma inversa con la ganancia de peso corporal, la adiposidad y la resistencia a insulina, así como relacionada de forma directa con la pérdida de peso provocada por el ejercicio o dieta baja en calorías. (Muller et al., 2015). La reciente identificación de un agonista inverso del receptor de ghrelina, LEAP2 producido por el hígado, ha abierto un nuevo nivel de complejidad en el estudio del papel del sistema de ghrelina (Al-Massadi et al., 2018).

Otro tejido implicado en el metabolismo de la homeostasis energética es, como ya se ha mencionado, el tejido adiposo blanco. Originalmente se consideraba un tejido poco relevante desde el punto de vista hormonal, pero actualmente está claro que es un órgano endocrino. La principal hormona que ha cambiado la forma en que se concebía al tejido adiposo blanco, ha sido la leptina. La mayoría de los individuos obesos se caracterizan por unos niveles altos de leptina en sangre, sugiriendo una resistencia o insensibilidad a esta hormona. La restricción de la ingesta, provoca una supresión en los niveles circulantes de leptina, que se revierten con la comida o la incorporación de insulina. Su administración crónica de forma periférica reduce la ingesta y resulta en la pérdida de peso corporal y la masa grasa (Casanueva and Dieguez, 1999; Halaas et al., 1995; Maffei et al., 1995; Zhang et al., 1994). Otras hormonas secretadas por el tejido adiposo blanco serían la adiponectina, cuyo incremento se produce después de la restricción calórica en roedores; y su administración atenúa la ganancia de peso sin modificar la ingesta, a través del aumento del consumo de oxígeno (Berg et al., 2001; Hu et al., 1996); o la resistina, que parece estar implicada en la modulación de la sensibilidad a insulina, contribuyendo a la resistencia de la misma (Nogueiras et al., 2003a; Nogueiras et al., 2003b; Savage et al., 2001). Finalmente, dentro de las señales periféricas relacionadas con la regulación del balance energético, cabe destacar la insulina, sintetizada en los islotes de Langerhans del páncreas, almacenada como proinsulina, que se libera al torrente sanguíneo en mayor medida en estado postprandial, principalmente estimulada por la ingesta de carbohidratos, y ejerciendo un efecto anorexigénico a través del sistema nervioso central (Banting et al., 1922; Saltiel and Kahn, 2001; Woods et al., 2003b) (Figura 1).

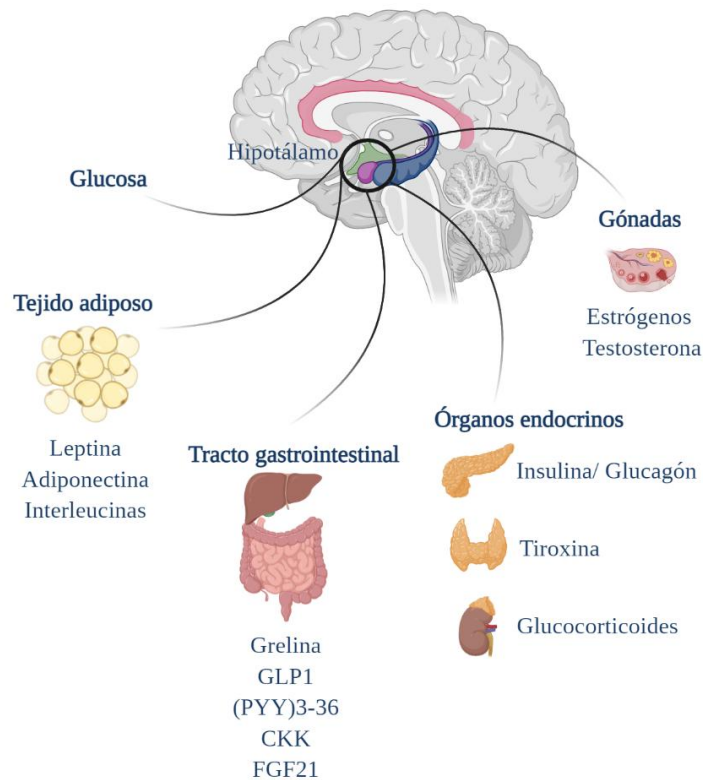


Figura 1. Integración a nivel central de hormonas derivadas del tracto gastrointestinal, el tejido adiposo, gónadas y órganos endocrinos. Creado con BioRender.com

## 1.2 EL HIPOTÁLAMO Y LA REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

El control de la homeostasis se produce en el sistema nervioso central, siendo el hipotálamo el mayor implicado, ya que la mayoría de las señales sensoriales y nutricionales llegan a este centro para proporcionar información sobre el estado nutricional del organismo. Está compuesto de diferentes poblaciones neuronales que se encuentran distribuidas en núcleos interconectados con el resto de regiones cerebrales. El hipotálamo se localiza debajo del tálamo, constituyendo la mayor parte del diencefalo ventral. Está unido en la parte anterior por el quiasma óptico, lateralmente por los tractos ópticos y posteriormente por los cuerpos mamilares, además de estar rodeado del círculo de Willis. Es una estructura simétrica que se encuentra dividida por el tercer ventrículo. Anteroposteriormente se diferencian tres zonas, el área preóptica (POA, *preoptic area*), se encarga principalmente de la termorregulación, la fiebre o el balance electrolítico entre otros. En la parte media, constituida por el hipotálamo tuberal y el infundíbulo que contacta a la hipófisis, se monitorizan el control de la ingesta y otras señales endocrinas. Finalmente, en la zona más posterior, se encuentran los cuerpos mamilares, regulando respuestas a estrés o el comportamiento de vigilia. La información recibida por el hipotálamo, por lo tanto, es integrada para emitir una respuesta a través de la regulación de la ingesta o el gasto energético. La regulación de la homeostasis energética se produce desde el hipotálamo a través del sistema nervioso autónomo con la activación del

sistema nervioso simpático (SNS, *sympathetic nervous system*). Esta ruta también afecta a la termogénesis, ya que el tejido adiposo pardo (BAT, *brown adipose tissue*) se ve inervado directamente por el SNS (Cansell and Luquet, 2016; Cypess et al., 2015; Labbe et al., 2015; Saper and Lowell, 2014; Yeo and Heisler, 2012).

Como ya se ha mencionado, el POA es uno de los principales centros del sistema nervioso en el que se integran las señales de temperatura. Recibe señales tanto periféricas como centrales para regular la temperatura corporal dependiendo de los estímulos del ambiente (Boulant, 2000; Fuller et al., 1975; Guieu and Hardy, 1970; Imai-Matsumura et al., 1984; Nakamura, 2011). Esta zona se conecta directamente con el VMH para activar la termogénesis del BAT en respuesta al frío, demostrándose esto al provocar la ablación del VMH, que inhabilita la activación de la termogénesis (Hogan et al., 1982; Preston et al., 1989). Por su parte, el VMH integra las señales periféricas como ya se ha dicho para modular el tono simpático que da lugar a la termogénesis del BAT y también en el WAT, a través del rafe pálido (rPa, *raphe pallidus*) y la oliva inferior (IO, *inferior olive*) en el troncoencéfalo (Cano et al., 2003; Lindberg et al., 2013; Martinez de Morentin et al., 2014a).

### 1.2.1 Núcleo Arcuato

El núcleo arcuato (ARC, *arcuate nucleus*) es uno de los núcleos más importantes en la regulación de la ingesta, está situado justo encima de la eminencia media, donde la barrera hematoencefálica (BBB, *blood brain barrier*) tiene más permeabilidad para dejar pasar señales periféricas al cerebro. Es un núcleo heterogéneo que contiene distintas poblaciones neuronales. Un grupo de neuronas se sitúan en la parte ventral del ARC, expresando péptidos orexigénicos como neuropéptido Y (NPY, *neuropeptide-Y*) y proteína relacionada con agouti (AgRP, *agouti related peptide*) (Broberger et al., 1998b; Hahn et al., 1998), principalmente proyectando al núcleo paraventricular (PVH, *paraventricular hypothalamous*). Una segunda población neuronal, en la zona más ventrolateral expresa productos anorexigénicos, como proopiomelanocortina (POMC) y el transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART, *cocaine and amphetamine regulated transcript*) (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998). En ambas poblaciones, además, también se produce el receptor de leptina (LepR, *leptin receptor*), señal periférica implicada en la regulación de la ingesta, como ya se ha mencionado anteriormente. Estos grupos neuronales se encuentran proyectando a otras zonas del cerebro o a núcleos hipotalámicos como el dorsomedial (DMH, *dorsomedial hypothalamous*), el lateral (LHA, *Lateral Hypothalamic Area*), el área perifornical y el PVH. El ARC proyectaría a núcleos de segundo orden (Flier, 2004; Palkovits, 2003; Schwartz et al., 2000; Simpson et al., 2009).

AgRP es un péptido de 132 aminoácidos que se comporta como un agonista inverso de los receptores de melanocortinas (MC4R, *melanocortin 4 receptor*) a través de la supresión de su actividad o promoviendo su endocitosis (Nijenhuis et al., 2001; Ollmann et al., 1997). Las neuronas AgRP inhiben directamente a las neuronas POMC en estado de déficit de energía, lo que lleva a un aumento de la ingesta. Su sobreexpresión, además, provoca un aumento de la masa corporal, incrementando la ingesta y disminuyendo el gasto energético (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997). NPY se colocaliza en la mayoría de las neuronas que expresan AgRP. El neuropéptido NPY fue descubierto como un estimulador de la ingesta con efectos en el gasto energético (Tatemoto et al., 1982). La inyección intracerebroventricular (ICV) de NPY provoca un aumento de la ingesta y su administración continuada da lugar a obesidad en

roedores (Raposinho et al., 2001). La leptina inhibe la producción de NPY reduciendo la hiperfagia y la obesidad en ratones ob/ob (Erickson et al., 1996). NPY actúa a través de cinco receptores (Y1-Y5), siendo los más importantes en relación a la regulación de la ingesta el Y1 y el Y5 (Nguyen et al., 2012). Los receptores NPY Y1 e Y2 se producen en neuronas POMC y su activación lleva a una inactivación de la actividad neuronal (Mercer et al., 2011). El receptor del neuropéptido Y5 (NPYR 5, *neuropeptide Y receptor 5*) también se encuentra implicado en la regulación de la liberación espontánea de la hormona estimulante de melanocitos ( $\alpha$ -MSH, *melanocyte-stimulating hormone*) desde las neuronas POMC, provocando una inhibición del sistema de melanocortinas (Galas et al., 2002).

Finalmente, estas agrupaciones neuronales, además, liberan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, *gamma-Aminobutyric acid*), cuya función es reducir la excitabilidad, provocando su liberación una inhibición de las neuronas AgRP/NPY (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Sternson and Atasoy, 2014). Estudios utilizando la tecnología DREADD (DREADDs, *designer receptors exclusively activated by designer drugs*), han demostrado que tanto GABA como NPY son necesarios para la rápida estimulación de la ingesta, mientras que AgRPa través de los receptores de MC4R, produce una respuesta más retrardada que induce la ingesta por un período de tiempo más prolongado (Krashes et al., 2013).

Las neuronas POMC se caracterizan por provocar una reducción de la ingesta, mientras que su ablación da lugar a hiperfagia y obesidad (Coll, 2007). Estas neuronas expresan péptidos incluyendo la  $\alpha$ -MSH y  $\beta$ -endorfinas (Chronwall, 1985; Jacobowitz and O'Donohue, 1978). Además, no sólo liberan péptidos derivados del gen POMC, sino también otros como endocannabinoides (Hentges et al., 2005), CART (Vrang et al., 1999) y marcadores colinérgicos (Meister et al., 2006), así como GABA y glutamato (Hentges et al., 2009).

Las melanocortinas liberadas en las neuronas POMC, como la ya mencionada  $\alpha$ -MSH, se unen a receptores MC4R y MC3R, lo que provoca una inhibición de la ingesta. La delección de estos receptores en ratones, resulta en hiperfagia y obesidad, por lo que se puede concluir que estos receptores tienen una función muy importante en la regulación de la ingesta (Simpson et al., 2009). Las neuronas POMC también co-expresan CART, siendo este transcrito inhibidor del apetito, como así lo demuestra su administración ICV, y el hecho de que el ayuno disminuya su expresión (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998; Thim et al., 1998). Se sabe que, además, en roedores la inyección de CART en el núcleo *accumbens* (implicado principalmente en el sistema de recompensa) inhibe la ingesta (Jean et al., 2007). Los niveles de mRNA de CART están modulados por la leptina circulante, aumentando a medida que lo hace esta hormona (Kristensen et al., 1998).

### 1.2.2 Núcleo ventromedial

Este núcleo se sitúa a ambos lados del tercer ventrículo, adyacente al ARC. Es el primer núcleo que se consideró con influencia en el balance energético y la regulación de la masa corporal. A parte de esta función se conocen también otras en las cuales interviene, como pueden ser el comportamiento sexual femenino o la función cardiovascular.

Las neuronas del VMH se caracterizan por constituirse en poblaciones segregadas que expresan el factor estereidogénico 1 (SF1, *stereidogenic factor-1*) y ejercen su función a



través del SNS, proyectando a otros centros autonómicos como pueden ser el núcleo parabraquial, locus cerúleo (LC, *locus coeruleus*), el núcleo retro trapezoide o el núcleo del tracto solitario (NTS, *nucleus tractus solitarii*). Estas fibras nerviosas también alcanzan otras zonas del hipotálamo como pueden ser el ARC o el PVH, además de estar ligadas a otras áreas del cerebro implicadas en la regulación de la termogénesis como son el RPa y la IO (Cano et al., 2003; Lindberg et al., 2013; Lopez et al., 2010). En el VMH también se expresan otros factores además del SF1, como pueden ser el receptor canabinoide 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 $\alpha$ , *estrogen receptor alpha*), el receptor de THs (Contreras et al., 2017b) 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).

A su vez, el VMH recibe inervaciones procedentes de las neuronas NPY, AgRP y POMC, procedentes del ARC (Ahima and Flier, 2000; Kahn and Flier, 2000). En este área podemos encontrar receptores como respuesta a señales de dopamina, serotonina, GABA o histamina (Paranjape et al., 2010). También se caracteriza por su capacidad de respuesta a glucosa y su implicación en el metabolismo de esta sustancia, mediando como consecuencia los efectos de hormonas asociadas como son leptina, insulina o grelina (Borg et al., 1995). Las mencionadas proyecciones que se reciben del ARC provocan una respuesta en el VMH que desencadena la síntesis de BDNF, generando una respuesta de anorexia por mediación de la leptina (Babic et al., 2010; Haque et al., 1999). La estimulación de este núcleo provoca aumentos en sangre de glucosa (Shimazu et al., 1966), estando mediada esta hiperglucemia por hormonas gluconeogénicas y la estimulación del SNS que inerva al hígado (Shimazu and Amakawa, 1968; Shimazu et al., 1966; Shimazu et al., 1991; Sudo et al., 1991). Además de aumentar en sangre, también se produce ese efecto en otros tejidos (Shimazu et al., 1991; Sudo et al., 1991). En el hígado se da un incremento de la producción de glucosa por acción del VMH por un lado, y se estimula la producción de glucagón, por otro lado, los tejidos periféricos aumentan el consumo de glucosa, subiendo los niveles de insulina, lo que mantiene estable la glucosa en sangre (Shimazu and Minokoshi, 2017).

El papel del núcleo ventromedial del hipotálamo también se ha relacionado con la integración de señales periféricas para regular la respuesta termogénica del BAT y del WAT (Bamshad et al., 1998; Bamshad et al., 1999). Al estimular el VMH, aumenta la temperatura del BAT, lo que se revierte eliminando la función de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Muchas son las señales periféricas que estimulan la termogénesis a través del núcleo ventromedial, como las hormonas tiroideas (THs, *thyroid hormones*) (Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b), la proteína morfogenética ósea 8b (BMP8b, *bone morphogenetic protein 8b*) (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012), la leptina (Tanida et al., 2013), el estradiol (Martinez de Morentin et al., 2014a), y fármacos como los análogos de GLP-1 (Beiroa et al., 2014) y la nicotina (Seoane-Collazo et al., 2014). Principalmente la acción de estas sustancias se produce a través de la inhibición de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*), que lleva a la activación de las fibras nerviosas simpáticas que inervan el BAT y el WAT, lo que conformaría un eje VMH- SNS- BAT a través del cual se da la termogénesis.

### 1.2.3 Núcleo Dorsomedial

El núcleo dorsomedial (DMH, *dorsomedial hypothalamic nucleus*) se encuentra implicado en procesos fisiológicos como la termorregulación, el estrés o ritmos circadianos (Schneeberger et al., 2014). Recibe proyecciones de otras áreas hipotalámicas como pueden ser el ARC, y las envía por su parte a otras, como la PVH y LHA (Guan et al., 1998). En sus neuronas también se expresan NPY y CART, influyendo en la fisiología del apetito, principalmente durante la gestación (García et al., 2003) y el ayuno (Henry et al., 2001). En el DMH, NPY regula el gasto de energía regulando la formación de los adipocitos de tipo marrón y consecuentemente, la termogénesis (Bi et al., 2012). Interesante es el hecho de que mientras en el ARC la leptina regula la expresión de NPY, en el DMH es independiente, se cree que estaría regulado por la CKK entre otros péptidos (Bi et al., 2003). En este núcleo es distintiva una población neuronal que expresa un péptido similar a la galanina (GALP, *galanin-like peptide*) (Jureus et al., 2000; Palkovits, 2003).

### 1.2.4 Núcleo Paraventricular

El PVH se sitúa a ambos lados del tercer ventrículo en la parte superior del hipotálamo anterior. Se considera un núcleo integrador, ya que recibe numerosas proyecciones de otras zonas cerebrales, regulando así el balance energético. Las principales áreas de las que se reciben esas proyecciones neuronales son otros núcleos hipotalámicos, el tronco cerebral, el hipocampo o señales sensoriales indicadoras del estado del organismo (Sutton et al., 2016). El núcleo PVH está inervado por proyecciones neuronales procedentes de neuronas NPY/AgRP y POMC/CART desde el núcleo ARC y también de neuronas que expresan orexina (OX, *orexin*) del núcleo lateral (Cowley et al., 1999; Elmquist et al., 1998; Elmquist et al., 1999; Li et al., 2000). Se caracteriza por ser un núcleo que expresa péptidos relacionados con la regulación de la ingesta tales como NPY,  $\alpha$ -MSH, serotonina, galanina, noradrenalina o péptidos de tipo opioide, siendo un núcleo cuya respuesta a estos neuropéptidos tiene implicación tanto en la ingesta como en el balance energético (Cone, 2005).

Existen dos tipos de neuronas en el núcleo PVH, conformando dos regiones distintas, estos tipos neuronales se conocen como neuronas parvocelulares y magnocelulares. Aquellas de la región parvocelular dirigen sus proyecciones principalmente al núcleo del tracto solitario, al vago y a la columna celular intermediolateral de la médula espinal (Seoane-Collazo et al., 2015). Desde el PVH se modulan la función del páncreas en cuanto a secreción hormonal, el almacenamiento de grasas, la termogénesis, la captación de glucosa y la glucosa hepática (Geerling et al., 2010; Hill, 2012; Stanley et al., 2010). Estas neuronas parvocelulares pueden secretar también en la eminencia media, lo que hace que este núcleo module las secreciones hormonales en la hipófisis. En el PVH se encuentran las neuronas que liberan la hormona liberadora de corticotropinas (CRH, *corticotropin-releasing hormone*), encargada de regular la ingesta, disminuyendo la primera (Cowley et al., 1999; Palkovits, 2003). Por otra parte, en las neuronas parvocelulares también se secreta la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, *thyrotropin-releasing hormone*), las cuales co- expresan CART. La TRH provoca como efecto último la inhibición de la ingesta y la regulación de la expresión de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, *thyroid stimulating hormone*) (Kow and Pfaff, 1991). Tanto la CRH como la TRH son estimuladas por las neuronas POMC/CART e inhibidas por las NPY/AgRP del ARC (Arase et al., 1988; Pandit et al., 2011; Schwartz et al., 2000). Estas hormonas reponden a estímulos sensoriales periféricos que informan de un déficit de energía,

provocando como consecuencia alterando el eje neuroendocrino, regulando a su vez el sistema nervioso autónomo, y finalmente modulando la actividad de los órganos periféricos (Jansen et al., 1997; Song et al., 2008; Stanley et al., 2010).

### *1.2.5 Área hipotalámica lateral*

El LHA se encuentra como parte esencial en la regulación de la ingesta y el balance energético. Lesiones en esta zona resultan en complicaciones en la alimentación, provocando una ausencia total en ocasiones (Anand and Brobeck, 1951; Palkovits, 2003). Comprende una amplia población de neuronas que se divide en subpoblaciones que expresan OX, MCH, GABA, Glutamato, Neurotensina o Sustancia P. Las más relevantes en el contexto de homeostasis energética son las que expresan OX y MCH, las cuales se inhiben con la leptina y se activan con la grelina (Goforth et al., 2014; Morrison et al., 1958). El LHA recibe proyecciones de neuronas AgRP, NPY y  $\alpha$ -MSH que interfieren con estas poblaciones de OX y MCH (Broberger et al., 1998a; Goforth et al., 2014; Horvath et al., 1999). Este área también es sensible a los niveles de glucosa (Bernardis and Bellinger, 1996).

Se han identificado dos tipos de receptores de MCH en humanos, Mchr1 y Mchr2, en ratones sin embargo sólo el primero. Por lo tanto, estudios de delección de Mchr1 en ratones demostraron que la depleción de este receptor afectaba al gasto energético, aumentándolo, a la actividad locomotora y no desarrollan obesidad dependiente de la dieta (Chen et al., 2002; Simpson et al., 2009). Por otro lado, también se ha provado a inyectar MCH en este núcleo, viéndose un incremento en la ingesta (Chen et al., 2002; Imbernon et al., 2013; Qu et al., 1996), además su sobreexpresión en ratones da lugar a obesidad y resistencia a insulina (Chen et al., 2002).

Por otro lado, como ya se ha dicho, otro péptido importante en este núcleo son las orexinas. Existen la orexina A y la orexina B, que actúan a través de los receptores OX1R y OX2R. La administración intracerebroventricular (ICV) de orexina en el área lateral aumenta la ingesta (Goforth et al., 2014; Lopez et al., 2007a; Lopez et al., 2000; Yamanaka et al., 2010), aún así los efectos de este péptido en la ingesta no están muy claros. Las orexinas están implicadas en la regulación del ciclo del sueño- vigilia, de tal forma que su ausencia provoca narcolepsia.

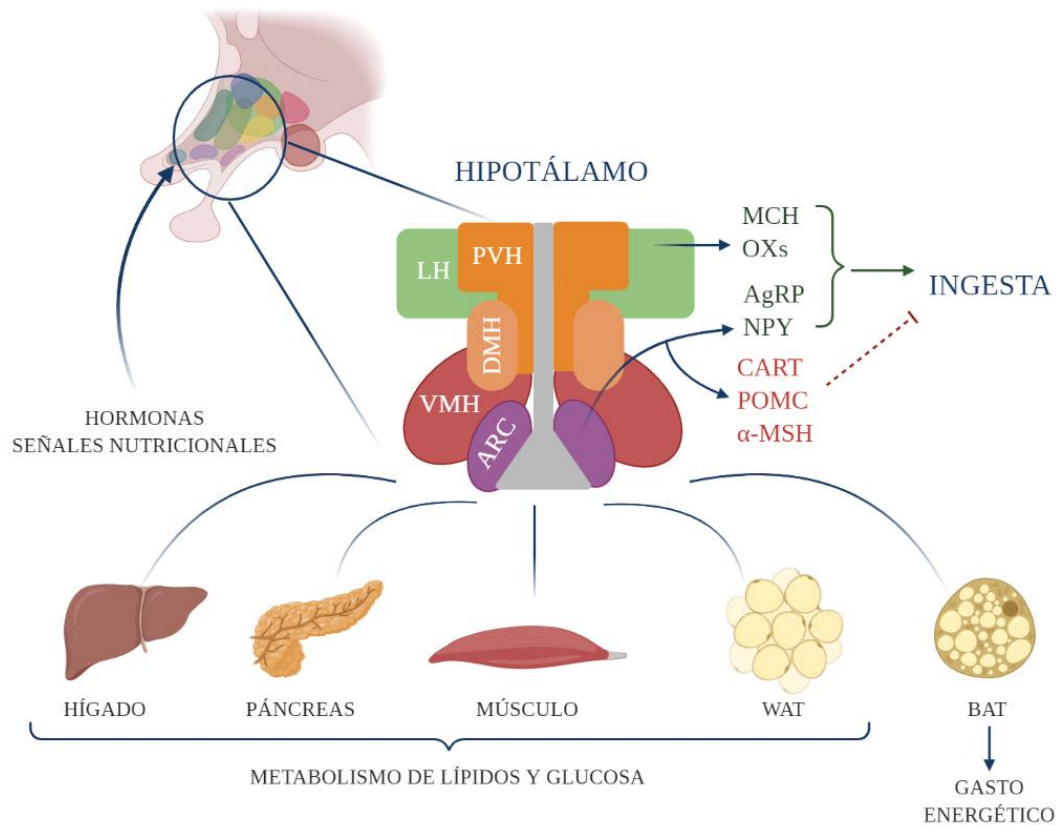


Figura 2. Regulación hipotalámica del balance energético. Creado con Biorender.com.

### 1.3 EL GASTO ENERGÉTICO Y LA TERMOGÉNESIS

El balance de energía de un individuo se mantiene a partir de un equilibrio entre la ingesta y el gasto energético. En el gasto energético uno de los factores a tener en cuenta es la termogénesis, que se podría definir como la producción de calor no relacionada con la actividad física (Cannon and Nedergaard, 2017; Landsberg et al., 2009; Nedergaard et al., 2007).

La termogénesis es un proceso fundamental para el mantenimiento de la temperatura en los animales homeotermos. Este proceso se produce esencialmente en el BAT, un tejido cuya especialización es principalmente producir calor (Cannon and Nedergaard, 2004), y en mamíferos de pequeño tamaño es importante ya que les permite generar calor independientemente de los músculos, que generarían calor mediante la termogénesis por temblor (Cannon and Nedergaard, 2004; Labbe et al., 2015). Al principio ese tejido se creía que se encontraba en animales, principalmente roedores e hibernantes, y en humanos recién nacidos, pero recientemente, mediante tomografía por emisión de positrones- tomografía computerizada (PET- CT, *positron emission tomography- computed tomography*) se ha descubierto que existe BAT funcional también en humanos adultos. Se observó la distribución del tejido marrón en las zonas subescapular, cervical, peri-espinal, mediastínica, periaórtica,



perirrenal y pericárdica (Cannon and Nedergaard, 2004; Cypess et al., 2009; Cypess et al., 2015; Lidell et al., 2014; Nedergaard et al., 2007; Virtanen et al., 2009; Zingaretti et al., 2009). En humanos se ha estimado que un BAT activado completamente contribuye al 5% de la tasa metabólica basal (van Marken Lichtenbelt and Schrauwen, 2011), mientras que en roedores se estima que puede aumentar el gasto energético en un 20 % (Contreras et al., 2015; Cypess and Kahn, 2010).

La morfología del BAT es perfectamente distinguible de la grasa blanca (WAT). En particular, los adipocitos marrones tienen una forma poligonal con numerosas gotas lipídicas multiloculares, además de un gran número de mitocondrias y se encuentra fuertemente innervado por fibras de tipo simpático (Cannon and Nedergaard, 2004; Granneman, 1988; Villarroya and Vidal-Puig, 2013; Whittle et al., 2011; Zingaretti et al., 2009). El WAT, por otro lado, es la principal fuente de reserva de grasa en el cuerpo, los adipocitos poseen sólo una gota lipídica unilocular que permite el almacenamiento de la grasa. Cabe destacar del BAT también, que se encuentra fuertemente vascularizado para que cuando se genere el calor resultante de la termogénesis, se disipe fácilmente (Goossens, 2008). Actualmente se acepta que los adipocitos marrones tienen un desarrollo que difiere del de los adipocitos blancos, apoyado esto por el hecho de que aún antes de la diferenciación, las células marrones y blancas expresan genes diferentes (Timmons et al., 2007; Tseng et al., 2008). Recientemente, se ha constatado el descubrimiento de otro tipo celular, presente tanto en roedores como en humanos. Se ha comprobado que las células marrones pueden constituirse en lugares anatómicos correspondientes a células blancas después de recibir estímulos termogénicos. Se las conoce como adipocitos beige o *brite* (*brown in white*). Estos tipos celulares derivan de células precursoras diferentes de los adipocitos marrones, y se encuentran más próximas a los linajes de células que dan lugar a los adipocitos blancos (Lidell et al., 2013; Sharp et al., 2012). A pesar de que el origen celular y el lugar anatómico de estos nuevos adipocitos difieran de los adipocitos marrones, este nuevo linaje tienen muchas de las características morfológicas y moleculares de los adipocitos marrones presentes en el BAT y también actúan como focos de termogénesis (Petrovic et al., 2010; Seale et al., 2008; Shabalina et al., 2013). Los adipocitos marrones provendrían de unas células precursoras que expresan el factor miogénico 5 (*Myf5*, *myogenic factor 5*), que también serían precursoras de miocitos (Crisan et al., 2008; Kajimura and Saito, 2014; Labbe et al., 2015) mientras que el linaje precursor de los adipocitos beige sería distinto del *Myf5*, más cercano a los adipocitos blancos. Sin embargo, la capacidad termogénica de este tejido *in vivo*, sigue siendo significativamente menor que la del BAT (Keipert and Jastroch, 2014; Shabalina et al., 2013). Este tipo de tejido adiposo marrón sería el que podríamos encontrar en los humanos adultos (Jespersen et al., 2013; Wu et al., 2012).

La termogénesis tiene lugar a través del desacoplamiento de ATP (adenosín trifosfato) producido a partir de la respiración mitocondrial, mediado por la proteína desacoplante 1 (UCP1, *uncoupling protein 1*), llamada también termogenina, y que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria (Cannon and Nedergaard, 2004; Nedergaard and Lindberg, 1982; Whittle et al., 2011; Zingaretti et al., 2009). A partir de la cadena de transporte de electrones, usando la oxidación de ácidos grasos como sustrato, UCP1 permite que los protones expulsados al espacio intermembranal a lo largo de la cadena de transporte electrónica, puedan volver a la matriz mitocondrial, provocando la disipación en forma de calor de la energía almacenada por el paso de los protones. UCP1, al igual que la ATP sintasa, es un canal de protones, pero no acopla el paso de estos a la producción de ATP, sino que

cataliza un aparente desaprovechamiento de esa energía en forma de calor (Cannon and Nedergaard, 2004; Jaburek et al., 2001; Nicholls, 1974).

La función del BAT está controlada tanto de forma central como periférica. El sistema nervioso simpático es esencial para activar la termogénesis en el BAT. Un incremento en la estimulación nerviosa de los nervios que inervan el BAT, lleva a una liberación de noreadrenalina en las terminaciones nerviosas y consecuente activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos expresados en el BAT, principalmente el subtipo  $\beta_3$ . Al ser receptores asociados a proteínas G, éstas se ven activadas, por lo que a su vez activan a la adenilato ciclasa (AC, *adenylate cyclase*), incrementando los niveles de AMPc (adenosín monofosfato cíclico), que a su vez activa la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*), provocando la termogénesis y la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, *mitogen activated protein kinase*) p38 (Cannon and Nedergaard, 2004; Cao et al., 2001). PKA provoca dos tipos de efectos en el BAT, agudos y crónicos. La respuesta aguda, incrementa la lipólisis, lo que lleva a un aumento de los niveles celulares de ácidos grasos libres. Esto se produce principalmente por la actividad de la lipasa adipocítica de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), la lipasa sensible a hormonas (HSL, *hormone-sensitive lipase*) y la monoacilglicerol lipasa (MGL, *monoacylglycerol lipase*). Estas tres lipasas provocan una hidrolización secuencial de los triglicéridos que dan lugar a ácidos grasos libres. Seguidamente, la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a, *carnitine palmitoiltransferase 1a*), transfiere los FFA a la mitocondria, donde se realiza su oxidación, que lleva a la formación de NADH y FADH, que serán a su vez también oxidados en la cadena de transporte de electrones (Cannon and Nedergaard, 2004; Clifford et al., 2000; Holm et al., 1987; Morimoto et al., 2001; Shih and Taberner, 1995; Whittle et al., 2011). Por otro lado, la estimulación crónica del BAT provoca un aumento de UCP1, de la biogénesis mitocondrial y en definitiva una hipertrofia del BAT (Bukowiecki et al., 1986; Cannon and Nedergaard, 2004; Lowell and Spiegelman, 2000; Martinez-Sanchez et al., 2017b). Su estimulación de forma prolongada puede tener efectos en el gasto energético, pero también en los niveles plasmáticos de triglicéridos y la homeostasis de la glucosa, debido a su capacidad de utilizar estos compuestos como sustrato (Bartelt et al., 2011; Guerra et al., 2001; Gunawardana and Piston, 2012; Meyer et al., 2010). Por todo ello, se ha postulado como una posible vía de tratamiento contra la obesidad u otras enfermedades metabólicas.

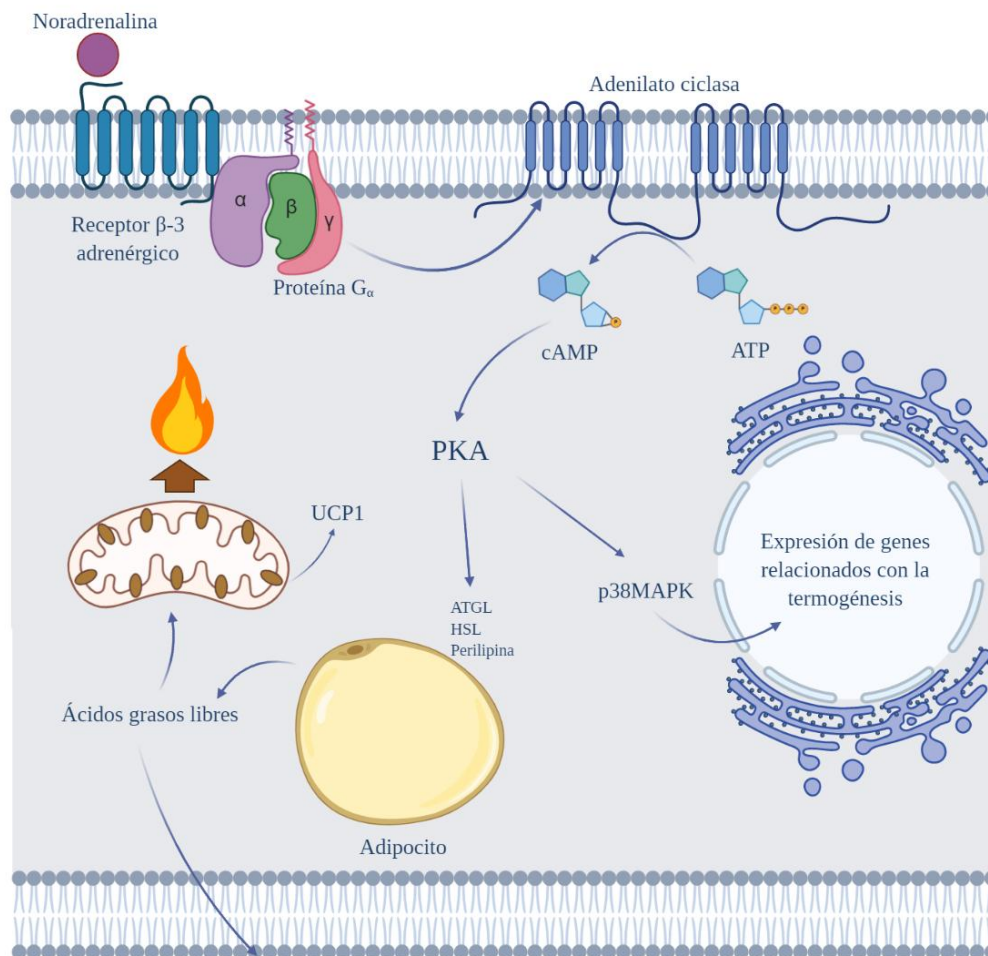


Figura 3. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT. Creado con BioRender.com

## 1.4 LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas son esenciales para el crecimiento y desarrollo de todos los vertebrados. Su síntesis y secreción está modulada por el eje hipotálamo- hipófisis- tiroides (HPT, *hypothalamous- pituitary- thyroid*). Es conocido que la producción de las hormonas tiroideas está gobernada por un mecanismo central que comienza en el núcleo PVH, sigue en la hipófisis y acaba en la tiroides. Las hormonas tiroideas circulantes regulan los componentes centrales mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. En la sección hipotalámica del eje, en el núcleo PVH, se encuentran las neuronas que liberan la hormona liberadora de tirotrópina (TRH, *thyrotropin- realeasing hormone*) en respuesta a señales fisiológicas o ambientales, como la temperatura. La TRH se libera en la eminencia media e induce la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, *thyroid- stimulating hormone*) en la hipófisis anterior, que a su vez, actúa sobre la tiroides, provocando que ésta libere hormonas tiroideas (T4: 3,3',5,5'-tetrayodotironina y T3: 3,5,3'-triyodotironina) al torrente sanguíneo. Los niveles altos de T3 y T4, provocan que la liberación de TSH se vea mermada, mientras que bajos niveles, activan su secreción (Brent, 2012; Little, 2006; Mebis and van den Berghe,

2009). La glándula tiroides produce en su gran mayoría tiroxina o T4, que tiene baja actividad biológica, pero es la que mayormente se localiza en sangre y es precursora de la triyodotironina o T3, que se produce al eliminar una molécula del anillo fenólico exterior, aumentando la actividad de esta hormona (Brent, 2012; Cheng et al., 2010; Warner and Mittag, 2012). T3 y T4 se producen en las células foliculares por medio de la yodación de los residuos de tirosina de la tiroglobulina, una glucoporteína, sin embargo, en el caso de la T3, su producción es generalmente local en cada tejido gracias a la acción de las deiodinasas intracelulares (Brent, 2012; Mebis and van den Berghe, 2009, 2011). En suero, las hormonas tiroideas se unen a proteínas de transporte, como la globulina fijadora de tiroxina (TBG, *T4-binding globulin*), transtiretina (TTR, *transthyretin*) y albúmina (Mebis and van den Berghe, 2009).

Una vez que las hormonas tiroideas son sintetizadas se produce su deiodinación, que implicaría la conversión de T4 a la forma activa, T3. Son tres las yodotironina desyodasas que catalizan la eliminación de un yodo de la molécula de T4 y sus derivados: deiodinasa tipo 1 (DIO1), deiodinasa tipo 2 (DIO2) y deiodinasa tipo 3 (DIO3). Estas tres enzimas pertenecen a un grupo de proteínas que pueden activar o inactivar las hormonas tiroideas (*dimeric integral membrane thioredoxin fold- containing proteins*) (Bianco and Kim, 2006; de Jesus et al., 2001; Mebis and van den Berghe, 2009). Mientras que DIO1 y DIO3 se localizan en la membrana plasmática, DIO2 se encuentra en el retículo endoplasmático (Bianco et al., 2002). La DIO1 se expresa principalmente en la tiroides, hígado y riñón. Cataliza la deiodinación del anillo fenólico, dando T3 a partir de T4, provocando su activación (Bianco and Kim, 2006; Mebis and van den Berghe, 2009). Esta deiodinasa no contribuye significativamente al mantenimiento de T3 circulante en humanos (Abdalla and Bianco, 2014; Bianco and Kim, 2006; Nguyen et al., 1998), aunque en roedores es responsable de aproximadamente la mitad de la producción de T3 fuera de la tiroides. Estudios en modelos genéticos de ratones KO (*knock out*) para DIO2 mostraron que su función podría ser principalmente la desiodinación de iodotironinas para su posterior eliminación en la orina (Schneider et al., 2006).

En el caso de DIO2, se considera una enzima clave para la regulación de la señalización local de T3 (Mebis and van den Berghe, 2009, 2011). Se encuentra principalmente en el cerebro, la tiroides, músculo esquelético y la hipófisis anterior y su función es principalmente convertir T4 en T3, la forma activa, y la rT3 (3,3'-5'-triyodotironina) a T2 (3,5-diiodo-L-tironina). Tiene una vida media corta, debido a la ubiquitinización y destrucción en el proteasoma, acelerado esto por su interacción con T4 (Gereben et al., 2000), lo que le confiere un control rápido de la producción de T3. DIO2 juega un papel importante también en la retroalimentación del eje HPT que regula la secreción de hormonas tiroideas. En relación a esto, se ha visto que modelos genéticos de ratones con una inactivación en el gen *Dio2*, conlleva una resistencia central a T4 (Schneider et al., 2001), un fenotipo que también se ha observado al inyectar un inhibidor de la DIO2, la amiodarona (Rosene et al., 2010). Esta deiodinasa juega un papel importante en la regulación de TRH (Fekete et al., 2004), ya que la T3 generada por DIO2 en los tanicitos, células especializadas localizadas en las paredes del tercer ventrículo, media el *feedback* negativo sobre las neuronas TRH (Freitas et al., 2010). Por otro lado, DIO2 también se encuentra implicada en la termogénesis adaptativa. Esto se debe principalmente a que el gen *Dio2* responde a cAMP (Bartha et al., 2000; Bianco et al., 1992; Canettieri et al., 2000), nucleótido producido en los adipocitos del BAT como respuesta a la liberación de norepinefrina. En esta línea, estudios con animales KO para *Dio2*, en condiciones de termoneutralidad y dieta alta en grasas, se ha visto que desarrollan obesidad y



esteatosis hepática (Castillo et al., 2011) Por otro lado, la T3 generada por DIO2 en el BAT acelera la oxidación de los ácidos grasos y protege contra la obesidad inducida por dieta (Fonseca et al., 2014)

La última deiodinasa, DIO3, media la degradación de las hormonas tiroideas, catalizando la conversión de T4 a rT3 y de la T3 a T2 (Arrojo E Drigo and Bianco, 2011; Arrojo E Drigo et al., 2013; Herwig et al., 2008). Se encuentra altamente expresada en tejidos embrionarios, en el cerebro y en la placenta (Dentice and Salvatore, 2011; Gereben et al., 2008). Es una deiodinasa con elevada importancia en el desarrollo embrionario, ya que la coordinación entre su expresión específica en cada tejido y la baja actividad de DIO2, proporcionan un estrecho control de la acción de las hormonas tiroideas (Bianco et al., 2002). La familia proteica *Hedgehog*, un grupo de factores que regulan la embriogénesis, se considera determinante en el control de las hormonas tiroideas durante el desarrollo embrionario, una de las razones es la estimulación de la expresión de DIO3 (Dentice, 2011; Dentice et al., 2007).

La acción de las hormonas tiroideas depende totalmente de sus receptores (TR, *thyroid receptor*). Pertenecen a la superfamilia génica de receptores nucleares, son factores de transcripción activados por ligando, que interaccionan con T3 a través del extremo C-terminal del dominio de unión a ligando (LBD, *ligand-binding domain*). Los cambios conformacionales en el LBD, determinan la acción de las hormonas tiroideas basándose en las proteínas coreguladoras que se reclutan, activadoras o represoras. Existen tres isoformas que se unen a T3: TR $\beta$ 1 y TR $\beta$ 2 son productos de un mismo gen, generados por splicing alternativo, mientras que el TR $\alpha$ 1 está codificado por un gen diferente, aunque comparte un alto grado de homología estructural con las isoformas TR $\beta$ . Las isoformas TR $\alpha$ 2 y TR $\alpha$ 3 tienen un extremo C-terminal que no une T3 (Robinson-Rechavi et al., 2001). La existencia de TR $\beta$ 3 se confirmó en rata (Williams, 2000) y en humanos recientemente se identificó la TR $\beta$ 4 (Moriyama et al., 2016). El papel de cada una de las isoformas parece estar más relacionado con su expresión específica en cada tejido, lo que se ha comprobado en estudios de modelos genéticos de ratones KO para cada isoforma (Brent, 2012). Estos receptores forman heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR, *retinoid X receptor*), otro receptor nuclear, y el complejo TR/RXR se une a regiones específicas del ADN, llamadas elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE, *Thyroid Hormone Response-Element*), que regulan la transcripción de genes diana (Chatonnet et al., 2015; Cheng et al., 2010; Wu and Koenig, 2000).

Las mutaciones en los genes *THRA* y *THRB* en humanos dan lugar a dos enfermedades genéticas diferentes llamadas RTH $\alpha$  y RTH $\beta$  (RTH, *resistance to thyroid hormone*) (Refetoff et al., 2014). La variante RTH $\alpha$  se descubrió en 2012, desde entonces se han identificado ocho posibles variaciones en el gen *THRA* en 14 pacientes, teniendo como consecuencia hipotiroidismo congénito con niveles de TSH y hormonas tiroideas circulantes ligeramente bajos, aunque cercanos a la normalidad, entre otros síntomas. Las variantes genéticas identificadas se localizan en el LBD, lo que dificulta la unión del receptor a T3 así como a correpresores, además de una actividad dominante negativa frente a otros receptores (Vlaeminck-Guillem et al., 2015). En contraste, RTH $\beta$ 1 se caracteriza por unos niveles de T3 y T4 anormalmente altos, debido a la alteración en la regulación del eje HPT, y también resulta en una sensibilidad más baja a T3 en las células que expresan tanto TR $\beta$ 1 como TR $\beta$ 2.

Las deiodinasas y los receptores se encuentran dentro de la célula, por lo que las hormonas tiroideas necesitan transportadores específicos, debido a su carácter hidrófilo. Se conocen varios tipos de transportadores para estas hormonas, NTCP (*Na<sup>+</sup>/taurocholate cotransporting polypeptide*), translocador de ácidos grasos (*fatty acid translocase*), transportadores de aminoácidos y miembros de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATPs, *organic anion-transporting polypeptide*) y la familia de proteínas de transporte monocarboxiladas (MCT, *monocarboxylate transporter*) (Visser et al., 2008). El transportador MCT8 tiene preferencia por T3, mientras que T4 y rT3 se transportan preferencialmente por OATP1C1 (Jayarama-Naidu et al., 2015; Meyer et al., 2010). Dentro de la familia de los MCT, el más importante es el MCT8, ya que es altamente selectivo para las hormonas tiroideas (Brent, 2012; Friesema et al., 2012; Friesema et al., 2010; Martagon et al., 2013). La estructura primaria de MCT8 forma doce dominios transmembrana, dando lugar a un canal que permite el transporte bidireccional de T3 a favor de gradiente. La dimerización de este transportador parece ser necesaria para su función (Fischer et al., 2015). Los modelos genéticos de ratones que carecen de MCT8 tienen una función neurológica normal, en parte por la compensación producida con la expresión de OATP1C1 durante el desarrollo, sin embargo, la falta de ambos receptores provoca malfunciones neurológicas, al igual que en los casos clínicos de humanos conocidos (Mayerl et al., 2014). El estado tiroideo, regula la expresión de MCT8, los niveles altos de T3 inhiben la expresión de MCT8, mientras que el hipotiroidismo, aumenta su expresión, siendo la función de estos receptores, regulada negativamente por los niveles de hormonas tiroideas.

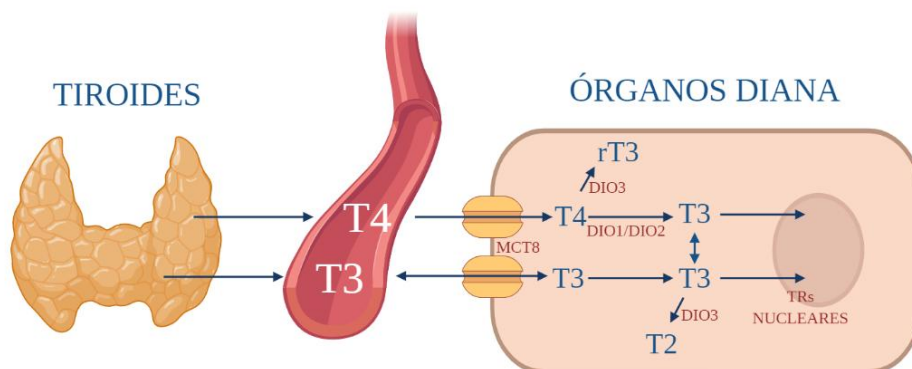


Figura 4. Síntesis y transporte de hormonas tiroideas. Creado con Biorender.com.

Las hormonas tiroideas incrementan la tasa metabólica basal del organismo, se hace evidente su importancia en la homeostasis energética en aquellos casos clínicos con desordenes tiroideos. En el caso de un exceso de producción de hormonas tiroideas por la sobreactivación de la tiroides, se produce hipertiroidismo, que conlleva un aumento del consumo de oxígeno y la temperatura corporal, dando lugar a un incremento en el metabolismo, pérdida de peso, aumento de la ingesta y taquicardia (Lopez et al., 2010; Warner and Mittag, 2012; Yehuda-Shnaidman et al., 2014). Los niveles bajos de hormonas tiroideas, dan lugar a hipotiroidismo, lo que provoca una elevada sensibilidad a temperaturas ambientales bajas, menor gasto energético y aumento de peso corporal, a pesar de disminuir la ingesta, en este caso se produce también bradicardia (Alkemade, 2010; Alkemade et al., 2005; Lopez et al., 2010; Warner and Mittag, 2012). Muchos casos de hipotiroidismo se dan en

pacientes obesos, sugiriendo un papel fundamental de estas hormonas en este tipo de patologías (Kaptein et al., 2009).

En lo que se refiere a su papel a la termogénesis, el BAT es una de las dianas directas de las hormonas tiroideas, ya que tiene un alto nivel de expresión de sus receptores, de forma que dichas hormonas actúan de forma sinérgica junto con la norepinefrina para generar una respuesta termogénica completa (Bianco et al., 1988; Lopez et al., 2013; Silva, 2006). Los receptores TR $\alpha$ , aseguran una buena respuesta termogénica en el BAT, mientras que los receptores TR $\beta$ , incrementan la expresión del gen de *UCP1* (Martinez de Mena et al., 2010; Ribeiro et al., 2010). Aproximaciones genéticas y farmacológicas han apoyado el distinto papel de las isoformas de los TRs, mostrando que la deficiencia de estos receptores conllevan hipotermia e intolerancia al frío, asociados con una reducción en la termogénesis del BAT debido a una señalización simpática deficiente, aunque la morfología y el desarrollo del BAT no se encuentran alterados (Golozoubova et al., 2004; Marrif et al., 2005; Ramadan et al., 2011; Sjogren et al., 2007; Wikstrom et al., 1998). Por otra parte, la DIO2 es una enzima importante en la fisiología del BAT en el caso de la termogénesis inducida por hormonas tiroideas (Bianco and Silva, 1987a, b, c). Estudios de modelos genéticos KO para DIO2, sugieren que la conversión de T4 a T3 es requerida para la respuesta del BAT a la señalización simpática para generar calor en respuesta a una exposición a frío (Castillo et al., 2011; Christoffolete et al., 2004; de Jesus et al., 2001). Esta evidencia ha sido confirmada en humanos, donde la exposición crónica a hormonas tiroideas, provocaba un aumento de la actividad y el volumen del BAT, así como la expresión de genes de respuesta a hormonas tiroideas, como puede ser *UCP1*, llevando a una mejora en el control de la glucosa (Skarulis et al., 2010). Por otro lado, recientes evidencias de nuestro grupo han cambiado la visión clásica de que la acción de las hormonas tiroideas sobre el SNS y el BAT ocurría principalmente de forma periférica, de forma que se ha conseguido demostrar cómo la acción central tiene una gran relevancia sobre su acción en todo el cuerpo, en lugar de la acción directa de estas hormonas sobre los tejidos (Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b).

Los cambios en el estado tiroideo están relacionados con alteraciones en los patrones de alimentación (Gonzalez et al., 2012; Lopez et al., 2007b; Pijl et al., 2001). El efecto orexigénico de las hormonas tiroideas está mediado por la modulación de neuropéptidos hipotalámicos que elevan los niveles de expresión de AgRP y NPY, además de una reducción en la expresión de POMC en el ARC de ratas hipertiroideas (Gonzalez et al., 2012; Ishii et al., 2003; Pijl et al., 2001; Varela et al., 2012). La acción de las hormonas tiroideas también se ha vinculado a la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, Mammalian Target of Rapamycin (Catania et al., 2011; Martinez de Morentin et al., 2014b; Varela et al., 2012). mTOR es una serina-treonina quinasa implicada en el ciclo y el crecimiento celular al detectar cambios en factores de crecimiento, nutrientes u oxígeno (Catania et al., 2011; Martinez de Morentin et al., 2014b). La ruta de mTOR se expresa en núcleos como son el ARC, donde se localizan los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos (Cota et al., 2006; Martinez de Morentin et al., 2014b). Evidencias en nuestro grupo han demostrado que la hiperfagia producida por el estado hipertiroideo está regulada por la activación de mTOR en el núcleo ARC, donde se colocaliza con TR $\alpha$ , y al administrar inhibidores de mTOR se revierte la hiperfagia inducida por el hipertiroidismo, respuesta debida a un equilibrio en la expresión de AgRP y NPY en el ARC (Varela et al., 2012). Por lo tanto, los estudios de nuestro grupo indican que las hormona tiroideas activan sensores metabólicos distintos en regiones

específicas, por un lado mTOR regula la ingesta en el ARC, mientras que AMPK en el VMH modula la termogénesis en el BAT (Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b; Varela and Horvath, 2012).

En lo que se refiere al metabolismo de la glucosa, las hormonas tiroideas regulan su producción hepática y también la sensibilidad a insulina a través del SNS desde el PVH (Fliers et al., 2010; Klieverik et al., 2009; Klieverik et al., 2008). El estado hipertiroideo provoca la liberación de glucosa por parte del hígado y la ablación del SNS contribuye a la reducción de la producción de la glucosa hepática, sin embargo, la parasimpatectomía parece alterar más bien la sensibilidad a insulina. Todo este proceso se puede observar también al inyectar T3 en el PVH, el núcleo donde se produce la TRH, ya que esta administración central requiere de un SNS intacto para que el eje PVH- hígado pueda controlar la liberación de glucosa (Klieverik et al., 2009; Konner et al., 2007; Konner et al., 2009; Obici et al., 2002).

## 1.5 ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

El retículo endoplasmático (ER, *endoplasmatic reticulum*), es un orgánulo extranuclear que proporciona un refugio temporal para los polipéptidos sin acabar de madurar, por lo que se encarga principalmente del plegamiento proteico, la maduración de las proteínas, el control de calidad y su posterior transporte al aparato de Golgi, entre otras funciones. Una vez que las proteínas han madurado y se han transportado al aparato de Golgi, aquellas que no han sido plegadas correctamente, atraviesan una degradación asociada al ER (ERAD, ER-associated Degradation), seguida de su destrucción por el proteasoma (Boden, 2009). Cuando existe un exceso de proteínas mal plegadas en el lumen del ER, se produce una respuesta en el retículo para reducir esta acumulación (UPR, unfolded protein response) (Yang and Hotamisligil, 2008). La UPR, es un mecanismo homeostático que busca un equilibrio entre la síntesis *de novo* de proteínas y su capacidad de plegarlas de forma correcta. Ciertas condiciones como la escasez de chaperonas, la sobrecarga proteica, el desequilibrio del contenido de calcio o la acumulación de colesterol, son las principales causas del desarrollo del estrés del RE (Cnop et al., 2012), también pueden deberse a la producción de especies lípidas reactivas como son los diacilglicéridos o las ceramidas (Contreras et al., 2014). Este exceso de lípidos, provoca una respuesta específica UPR, que en el peor de los casos puede derivar en apoptosis. La acumulación de especies reactivas se puede producir sobre todo en las células  $\beta$  pancreáticas, hígado, corazón y músculo esquelético, lo que se conoce como lipotoxicidad (Eizirik et al., 2008; Lee et al., 1994; Lelliott and Vidal-Puig, 2004; Medina-Gomez et al., 2007; Unger, 2002; Zhou et al., 2000). Este fenómeno de acumulación de depósitos grasos en ciertos órganos no destinados a esta función, puede deberse a un fracaso en el almacenamiento del tejido adiposo, redireccionando este exceso a otros tejidos. Los lípidos juegan un papel importante en la regulación del balance energético en el hipotálamo, lo que puede significar que existe un papel fisiopatológico de la lipotoxicidad. El papel de este estrés en la diabetes, obesidad, enfermedad del hígado graso, enfermedades cardiovasculares o algunos cánceres ha sido ampliamente estudiado (Piperi et al., 2012).

La UPR está mediada por tres sensores proteicos de tipo transmembrana que se regulan de forma negativa por una chaperona llamada proteína de unión a inmunoglobulina (GRP78 o BIP, *immunoglobulin binding protein*). En condiciones de estrés los niveles de esta chaperona se ven incrementados debido a una acumulación de proteínas mal plegadas, estos tres sensores se ven entonces liberados, lo que promueve la reducción de la traducción, un incremento del



plegamiento proteico o también la degradación de las proteínas mal plegadas (Lee and Ozcan, 2014; Ramirez and Claret, 2015; Walter and Ron, 2011).

- Proteína quinasa del ER (PERK, *PKR-like ER kinase*): es una proteína transmembrana que en condiciones de estrés dimeriza, se autofosforila y se activa el dominio quinasa, produciéndose como consecuencia la inhibición del factor alfa 2 de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 $\alpha$ ,  *$\alpha$  eucaryotic translation initiation factor*), lo que provoca una disminución de la síntesis de las proteínas totales del ER (Cao and Kaufman, 2013; Harding et al., 2000; Ma et al., 2002), ya que es un factor clave en la síntesis proteica en eucariotas. Por otro lado, se ve incrementada la expresión del ARN mensajero del factor de transcripción activador 4 (ATF4, *activating transcription factor 4*), que a su vez, estimula la expresión de genes involucrados en la importación de aminoácidos y la síntesis de glutatión. A través de estas vías, se reducen las proteínas mal plegadas. Uno de los genes regulados directamente por ATF4, es la proteína homóloga de la proteína de unión potenciadora de CCAAT (CHOP, *homologous protein CCAAT- enhancer-binding protein*), un activador transcripcional del programa apoptótico (Kim et al., 2015).
- Enzima 1-inositol dependiente (IRE, *inositol-requiring protein 1*): es una endonucleasa de la cual existen dos isoformas,  $\alpha$  y  $\beta$  (Tirasophon et al., 1998). Esta enzima se encuentra asociada a GRP78, cuando se induce una situación de estrés, es liberada tras su dimerización y autofosforilación. El siguiente paso es la expresión de la proteína de unión box- X 1 (XBP1, *X-box binding protein- 1*), siendo esta un factor de transcripción que está involucrada en la respuesta UPR, interviniendo en el plegamiento proteico (Bertolotti et al., 2000; Calton et al., 2002; Gardner and Walter, 2011; Lee et al., 2002). Como consecuencia, los niveles de los componentes de la ERAD, proteínas de choque térmico del ER y la síntesis de fosfolípidos, se ven incrementados. Todo esto, lleva a la expansión de la membrana del ER y se reduce la entrada en el lumen de más proteínas. En el hígado, IRE1 y XBP1, están involucrados en la síntesis de triglicéridos y el metabolismo lipídico (Wang and Kaufman, 2012).
- Factor activador de transcripción 6 (ATF6, *Activating transcription factor 6*): es una proteína transmembrana tipo II, encontrándose dos tipos, ATF6 $\alpha$  y ATF6 $\beta$  (Yoshida et al., 2001a; Yoshida et al., 2001b). Cuando se inicia el estrés del RE, ATF6 se disocia de GRP78, es trasladado al aparato de Golgi donde es digerido por proteasas (Bommiasamy et al., 2009). El fragmento N- terminal actúa como activador de numerosos genes implicados en la síntesis de lípidos y la maquinaria ERAD. Por otro lado, también activa genes que inducen la producción de más GRP78, GRP94, XBP1 o CHOP (Haze et al., 1999; Piperi et al., 2012; Shen et al., 2014; Yan et al., 2008).

Aún a pesar de todo esto, puede que no se resuelva el estrés del RE, por lo que la célula se encuentra en una situación comprometida, lo que provoca mecanismos de apoptosis y muerte celular (Hotamisligil, 2006).

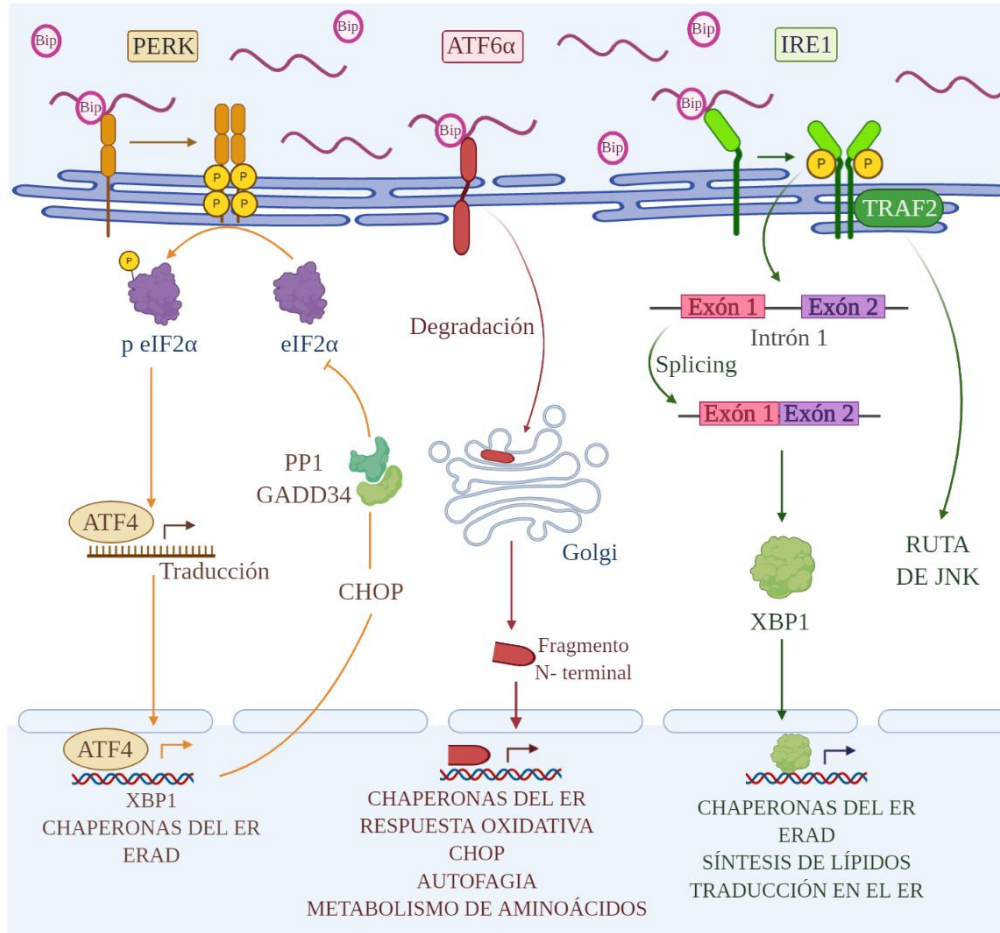


Figura 5. Mecanismo de regulación de la termogénesis en el BAT. Creado con BioRender.com.

Durante la obesidad, el exceso de energía es almacenado como gotas lipídicas en los adipocitos y, como ya se ha mencionado, este almacenamiento también puede ocurrir en otros tejidos como hígado, páncreas, corazón o músculo. Los adipocitos son células destinadas al almacenamiento de energía, pero también el tejido adiposo puede actuar como un órgano, involucrado tanto en la inflamación, como en el metabolismo energético. La lipotoxicidad es una de las causas de daño celular en condiciones patofisiológicas. Durante este proceso, las células atraviesan un estrés que implica la acumulación de proteínas para la formación de gotas lipídicas, así como para cubrir el gasto energético. Algunas hormonas, como adipocinas o la insulina, trabajan para la utilización y el almacenamiento de esta energía (Achar and Laybutt, 2012; Rosen and Spiegelman, 2006).

Numerosas evidencias, han demostrado que las neuronas del hipotálamo son capaces de detectar los ácidos grasos circulantes, y que el metabolismo endógeno en esta área del cerebro, es clave para la regulación del balance energético de todo el cuerpo (Martínez de Morentin et al., 2010). Estudios en roedores expuestos a dietas altas en grasas, mostraron elevadas concentraciones de ácidos grasos libres en el hipotálamo, lo que conlleva a la acumulación de palmitoil- CoA y otras especies (Benoit et al., 2009; Posey et al., 2009). Se ha descrito que la lipotoxicidad hipotalámica se encuentra relacionada con el estrés del RE, y sería una de las explicaciones para el desarrollo de la obesidad y además se ha demostrado

que el palmitato en exceso conlleva a estrés del retículo y apoptosis (Choi et al., 2010; Cragle and Baldini, 2014; Mayer and Belsham, 2010; McFadden et al., 2014). Además, estudios *in vivo* han descrito como la inyección de ácidos grasos saturados, en particular el ácido araquidónico (C20:0), iducen estrés del retículo en el hipotálamo de ratas (Cragle and Baldini, 2014). También se han identificado las ceramidas como otro de los inductores de la lipotoxicidad hipotalámica y el estrés del RE (Contreras et al., 2014). Las ceramidas son una familia de lípidos que se conforma a partir de una esfingosina que se une covalentemente a un ácido graso de longitud y saturación variable. Estos lípidos se consideraban como simplemente componentes de la membrana celular, pero se ha visto que el incremento de ceramidas se produce con casi cualquier estímulo que provoque estrés (Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002; Sawai and Hannun, 1999). Las ceramidas se pueden obtener de varias formas, como su síntesis de novo en el ER, a partir de moléculas menos complejas, proceso en el cual la enzima limitante es la C-palmitoiltransferasa (SPT) o mediante la vía de rescate o recuperación; a través de la cual las ceramidas se obtienen de otro esfingolípido. La liberación central de ceramidas aumenta los marcadores del estrés del retículo en el hipotálamo, causando un aumento del peso corporal debido a un descenso en el tono simpático hacia el BAT, por lo que también se reduce la termogénesis. La sobreexpresión de GRP78 en el núcleo VMH del hipotálamo, revierte el estrés del ER inducido por las ceramidas, se puede ver también el efecto opuesto inactivando esta chaperona con virus dominante negativo. Por otro lado, la sobreexpresión de GRP78 en ratas Zucker, provoca una mejora del perfil metabólico de estas y aumentaba la señalización a través de leptina en el VMH. Todos estos datos, en su conjunto, identificaron a la acumulación de ceramidas como un proceso de gran importancia en el desarrollo del estrés del RE y la obesidad (Contreras et al., 2014).

Dado que la lipotoxicidad en el hipotálamo provoca efectos negativos sobre el metabolismo, prevenir la acumulación de lípidos y la formación de especies tóxicas, podría mejorar estas alteraciones. Una de las estrategias que se ha utilizado para testar esta hipótesis, fue incrementar la oxidación de los ácidos grasos a través de aproximaciones farmacológicas (Mayer and Belsham, 2010; McFadden et al., 2014), por otro lado, también se ha intentado aumentar la demanda de estos lípidos acumulados, mediante ejercicio físico *in vivo* (Kim et al., 2010; Ropelle et al., 2010). También se han realizado estudios para la inhibición de la síntesis de novo de las ceramidas, por medio de aproximaciones tanto farmacológicas como genéticas, lo que ha resultado en una mejora en la sensibilidad a insulina y en la homeostasis de la glucosa (Summers et al., 1998; Yang et al., 2009). Como ya se ha mencionado, la lipotoxicidad en el hipotálamo reduce el tono simpático hacia el BAT y la termogénesis, produciendo una ganancia corporal independiente de la ingesta (Contreras et al., 2014), aún así queda por dilucidar la vinculación entre estrés del RE y hormonas tiroideas.

## 1.6 AMPK: EL SENSOR ENERGÉTICO

La quinasa activada por AMP (AMPK, AMP- activated protein kinase) es una proteína que se encuentra expresada de forma ubicua en todos los tejidos. Es una serín/ treonín quinasa muy conservada en la evolución. Es un heterotrímero conformado por subunidades catalíticas  $\alpha$  ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ ), subunidades regulatorias  $\beta$  ( $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ), lo que resulta en 12 combinaciones de complejos de AMPK (Lage et al., 2008). La actividad de AMPK se incrementa en respuesta a alteraciones en los nucleótidos de adenina, específicamente, una reducción del ATP y una elevación en AMP y ADP (Gowans et al., 2013), conllevando la

activación de AMPK por la fosforilación del residuo de treonina 172 (Thr 172), en la subunidad catalítica  $\alpha$  por la quinasa del hígado B1 (liver kinase B1, LKB1) y por la proteína quinasa-quinasa 2 dependiente de calcio/calmodulina (CaMKK2, calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2) (Hardie, 2013; Oakhill et al., 2012; Woods et al., 2003a). Por otro lado, AMP y ADP también tienen la capacidad de inhibir la desfosforilación de la subunidad  $\alpha$  en la Thr172 a través de la proteína fosfatasa 2C alfa (PP2C  $\alpha$ , protein phosphatase 2C alpha). La fosforilación de AMPK por cambios en AMP, es independiente de aquella debida a los cambios en calcio, por lo tanto, un incremento en los niveles de calcio, activa a la CaMKK2 fosforilando consecuentemente a AMPK en la Thr172 (Sanders et al., 2007). AMPK también responde a cambios en los niveles de carbohidratos, provocándose una supresión de AMPK cuando los niveles de glucógeno se encuentran altos y un aumento cuando la glucosa en la célula se encuentra en niveles bajos (Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2013). Una vez activada, AMPK modula el metabolismo a través de la fosforilación de proteínas clave y factores de transcripción que promueven rutas catabólicas, mientras que por otra parte inhibe aquellas anabólicas. En el músculo esquelético y el hígado, AMPK promueve la absorción de glucosa y ácidos grasos, aumenta el funcionamiento mitocondrial y la oxidación de los ácidos grasos, suprimiendo la síntesis de lípidos y colesterol. Durante el ejercicio aumenta la actividad de AMPK en el músculo esquelético, siendo de gran importancia en este contexto para la absorción de glucosa (Kjobsted et al., 2018; O'Neill et al., 2011).

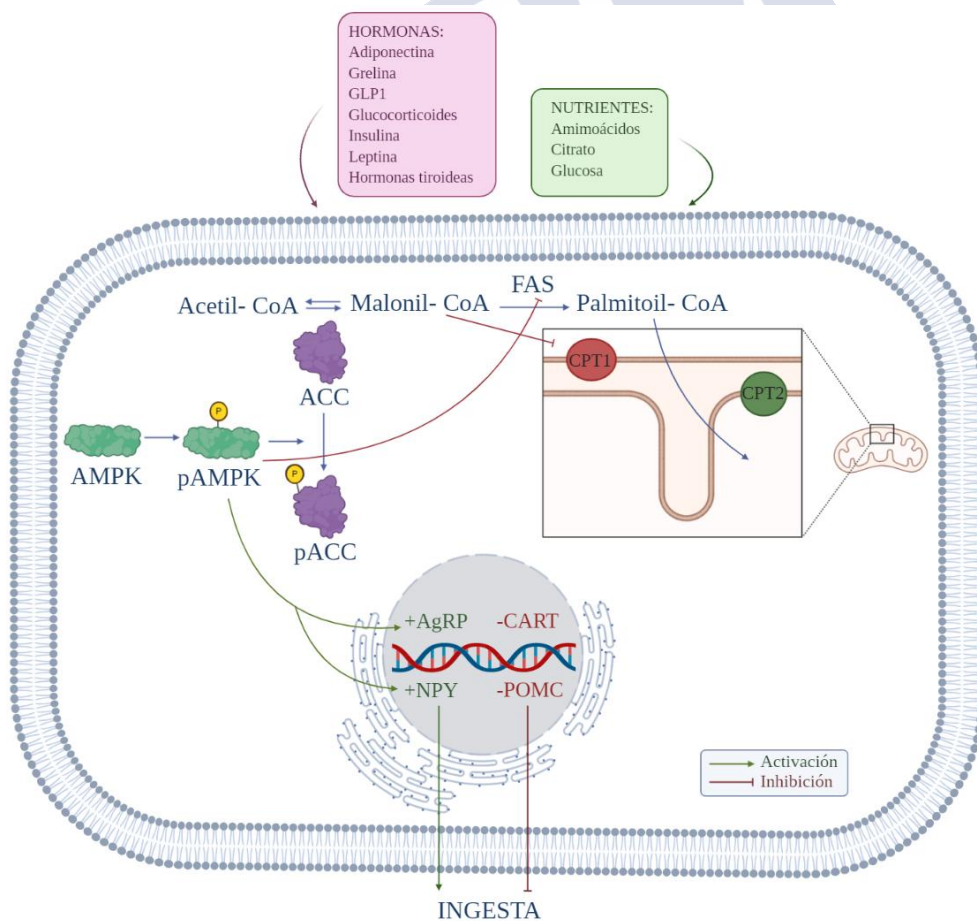


Figura 6. Mecanismo hipotalámico que integra señales periféricas con los sistemas de neuropéptidos. Creado con BioRender.com.



Como ya se ha mencionado anteriormente, el hipotálamo tiene un papel de gran importancia en la modulación del BAT y la termogénesis. El BAT se activa por un aumento de la señalización simpática. En concreto, el VMH fue uno de los primeros núcleos descrito con gran importancia en el programa termogénico del BAT (Perkins et al., 1981). Además de ello, recientes estudios han demostrado que AMPK en el hipotálamo también es un punto clave en esta regulación. Con la inyección central de T3 en el VMH, se ha podido inducir un aumento en la actividad termogénica asociado con una disminución de la fosforilación de AMPK $\alpha$  en el VMH. Esto también se encuentra acompañado de un aumento de la señalización simpática hacia el BAT (Alvarez-Crespo et al., 2016; Lopez et al., 2013; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b). Más datos de nuestro grupo han demostrado que la inhibición de AMPK junto con la administración central de T3, inducen la activación del browning en el tejido adiposo blanco, producido también por un aumento del SNS, además, se ha podido comprobar cómo el sistema nervioso parasimpático aumenta la lipogénesis hepática (Contreras et al., 2014; Contreras et al., 2017a). Las rutas metabólicas detrás de estos efectos, son el ER estrés provocado por las ceramidas y la activación de la quinasa c- Jun N- terminal 1 (JNK1, c- Jun N- terminal kinase) en el VMH (Martinez-Sanchez et al., 2017b). Estos mecanismos no sólo están adscritos a la acción de las hormonas tiroideas, también se sabe que los estrógenos (E2), a través del receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) provocan un descenso en los niveles del AMPK activo, induciendo un descenso en los niveles de AMPK en el VMH, induciendo un aumento en la capacidad termogénica del BAT, de forma independiente de la ingesta (Lopez and Tena-Sempere, 2015, 2016, 2017; Martinez de Morentin et al., 2014a; Martinez de Morentin et al., 2015). También en nuestro grupo se ha demostrado que la proteína morfogenética 8b (BMP8b, bone morphogenetic protein 8B), actúa de forma central en la modulación de la actividad termogénica, dependiendo este proceso de la activación de AMPK en el VMH. La inyección central de virus de AMPK $\alpha$  constitutivamente activos, que provocan un aumento de los niveles en proteína de AMPK, en el VMH, reduce los efectos de BMP8b en la termogénesis (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012). De esta forma, al ver que la manipulación virogenética de AMPK $\alpha$  en el VMH, puede activar o inhibir la termogénesis o el *browning* de la grasa blanca, nuestro laboratorio decidió identificar las poblaciones neuronales que estarían implicadas en este proceso. Para ello, se generaron ratones KO de AMPK  $\alpha$ 1 en las neuronas que expresan el factor esteroidogénico 1 (SF1, steroidogenic factor 1), cruzando animales AMPK  $\alpha$ 1 floxed con ratones SF1 cre, los cuales expresarían la recombinasa cre bajo el promotor de SF1, delecionando así AMPK  $\alpha$ 1 en aquellas neuronas que expresan SF1. Los ratones resultantes muestran un descenso del peso corporal y adiposidad de una forma independiente de la ingesta, lo que se asocia en estos animales con mayor gasto energético, más actividad del BAT y termogénesis. Todos estos hallazgos han demostrado que AMPK en el VMH, concretamente en las neuronas SF1, es un mecanismo canónico de gran importancia para la regulación de la termogénesis (Lopez, 2017, 2018; Lopez et al., 2016; Martinez-Sanchez et al., 2017b).

Se ha demostrado que AMPK en el hipotálamo está implicada en la regulación del balance energético (Andersson et al., 2004) también a nivel de la ingesta, ya que hormonas clave como pueden ser la grelina o la leptina regulan los niveles de esta quinasa. AMPK se encuentra además altamente expresada en los núcleos del hipotálamo como son ARC, DMH, PVH, LHA y VMH (Minokoshi et al., 2004). En relación con esto, se sabe que los niveles de AMPK aumentan durante el ayuno en varios de estos núcleos hipotalámicos, situación que se revierte al incorporar alimento (Minokoshi et al., 2004). Este aumento provoca que se estimule la ingesta, llevando a un aumento de peso corporal, mientras que la disminución de

expresión de AMPK, reduce la ingesta y por ello el peso corporal. Estudios de virogenética con virus dominante negativos de AMPK han permitido ver que se produce una disminución en los neuropéptidos orexigénicos AgRP y NPY, y una sobreexpresión de AMPK con virus constitutivamente activos, producen un aumento de estos péptidos. En modelos genéticos con ratones KO para la subunidad catalítica  $\alpha 2$  en las neuronas POMC y AgRP se ha podido comprobar que AMPK ejerce su acción en la ingesta de forma núcleo-específica. Estos dos modelos mostraron dos fenotipos distintos, los ratones AMPK- $\alpha 2$ - POMC KO desarrollaron hiperfagia con su consecuente aumento de peso corporal, mientras que los animales AMPK  $\alpha 2$ - AgRP KO un fenotipo delgado (Claret et al., 2007). A pesar de todo esto, más estudios indican que los cambios en el peso corporal asociados a AMPK están asociados a cambios en el gasto energético, más que una modificación de la ingesta (Beiroa et al., 2014; Lage et al., 2008; Lopez et al., 2010; Martins et al., 2016; Schneeberger and Claret, 2012; Whittle et al., 2012).

## 1.7 PAPEL DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENO

Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK, mitogen-activated protein kinases), son serían treonin proteín quinasas que se activan en respuesta a estímulos de estrés extracelular. Una vez activadas, estas quinasas, que se expresan de manera ubicua, fosforilan un amplio rango de proteínas aguas abajo, con residuos de serina y treonina (Cargnello and Roux, 2011). Estas proteínas incluyen factores de transcripción como pueden ser la proteína similar al factor de transformación específico de eritroblastos 1 (ELK-1, Erythroblast transformation specificlike protein-1), el factor activador de transcripción (ATF, activation transcription factor), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, signal transducer and activator of transcription 3), el supresor de tumores p53 y quinasas que se encuentran aguas abajo que incluyen las quinasas activadas por MAPK (MAPKAPK, MAPK activated protein kinases). Estas interacciones están mediadas por proteínas de acople o proteínas de andamiaje, que aseguran la interacción óptima entre enzima y sustrato y su especificidad (Sheridan et al., 2008). La ruta de las MAPK induce múltiples respuestas celulares que incluyen proliferación, diferenciación o apoptosis (Raman et al., 2007; Wada and Penninger, 2004; Zhang and Liu, 2002). Las tres familias de MAPK incluyen: las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2, Extracellular signal- regulated kinases 1/2); que se activan por mitógenos, quinasas c-Jun- N terminal (JNK1, c-Jun N terminal kinases) y la proteín quinasa activada por estrés p38 (p38SAPK, stress activated protein kinase p38); estimuladas por señales de estrés, y ERK5; que se activa por mitógenos y señales de estrés. Las tres vías de señalización de MAPK son activadas por la cascada clásica de tres niveles, compuesta por MAP quinasas, quinasas de otras MAP quinasas (MAP2K) y por quinasas de quinasas que fosforilan a otras MAP quinasas (MAP3K), situadas aguas arriba de las MAP2K. Por otro lado, a parte de esta vía de tres ramas, existen MAPK denominadas atípicas, que serían ERK3 y ERK4, que simplemente necesitan ser fosforiladas en un residuo para desencadenar toda una respuesta celular, aunque se necesitan más estudios para determinar completamente sus funciones (Coulombe and Meloche, 2007).

### 1.7.1 Módulo ERK 1/2

Las isoformas ERK1 y ERK2 tienen un 84% de homología y se refieren habitualmente como ERK1/2 (Cargnello and Roux, 2011; Pearson et al., 2001). Estas proteínas quinasa se expresan de forma ubicua en los tejidos y son activadas por su fosforilación en dos sitios, tirosina y treonina. Numerosos estudios han sugerido una función similar, ya que la mayoría

de los estímulos conocidos activan de forma paralela tanto ERK1 como ERK2, y su función en la proliferación celular es dependiente de la actividad de total de ambas ERK (Lefloch et al., 2009). Estas isoformas están activadas principalmente por factores de crecimiento, mediado todo por el módulo de las MAP3K; en concreto por las quinasas de fibrosarcoma rápidamente acelerado (Raf, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma), y seguidamente por quinasas MAP2K, en este caso, las quinasas asociadas al eje cromosómico meiótico 1 y 2 (MEK1 y 2, meiotic chromosome-axis-associated kinase) (Robbins et al., 1993; Roskoski, 2012). (Roskoski, 2010; Zheng and Guan, 1994). Como se ha mencionado anteriormente, ERK1 y 2 activadas, interactúan con proteínas que se relacionan con el crecimiento celular, proliferación, migración, diferenciación y supervivencia celular. Estudios recientes han determinado también su relación con la apoptosis (Wada and Penninger, 2004). Las proteínas sustrato de ERK 1/2 se sitúan en el citoplasma y el núcleo, siendo las citoplasmáticas de la familia de las quinasas S6 ribosomales (RSK, Ribosomal S6 kinase), una familia de proteínas relacionadas con la proliferación celular, crecimiento celular y supervivencia (Carriere et al., 2008). Esta familia es conocida por inactivar la apoptosis, mientras que favorecen la proliferación celular a través de la regulación de factores de transcripción relacionados con la síntesis de proteínas. También ERK 1 y 2 se relacionan con la motilidad celular fosforilando proteínas que se unen a la actina, implicada en la remodelación del citoesqueleto (Viala and Pouyssegur, 2004). En lo que se refiere al núcleo, ERK 1/2 fosforilan también factores de transcripción y proteínas que los regulan, siendo el más importante ELK1, que media la transcripción del protooncogén *cFos*, que junto con *cJun* provocan la transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1, protein activator 1), implicada en numerosos procesos celulares (Angel and Karin, 1991; Babu et al., 2000).

### 1.7.2 Módulo JNK

JNK1, JNK2 y JNK3 tienen aproximadamente un 85% de homología en sus secuencias aminoacídicas, se activan por fosforilación en un residuo de tirosina y otro de treonina. Son transcritas por tres genes, JNK1, JNK2, JNK3 que pueden sufrir *splicing* alternativo, dando lugar a 10 variantes distintas. JNK1 y 2 se expresan de forma ubicua en todos los tejidos, y tienen funciones celulares parecidas, mientras que JNK3 se expresa principalmente en neuronas y cardiomiocitos (Antoniou et al., 2011; Kuan et al., 2003; Rose et al., 2010), aunque recientemente nuestro grupo ha demostrado la importancia de JNK1 en neuronas SF1 en el reclutamiento de ácidos grasos en el hígado, por la activación del sistema nervioso parasimpático (Martinez-Sanchez et al., 2017b). JNK1 y 2 se activan bajo el control de MAP3K y de MAP2K que se encuentran en la ruta de este módulo. Esta cascada se inicia por estímulos de estrés que incluyen citoquinas inflamatorias, hipoxia o radiaciones. Estudios recientes han demostrado que las quinasas de linaje mezclado (MLK, Mixed Lineage Kinases), en concreto MLK3, que pertenecen a las MAP3K, están relacionadas con la regulación de JNK y se incrementan en respuesta a las especies reactivas del oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species) (Lee et al., 2014). La activación de las MAP3K resulta en la fosforilación, aguas abajo, de las MAPK duales MKK4 y MKK7, que activan específicamente a JNK 1/2, pero no interactúan con el módulo de las ERK 1/2, además son imprescindibles para la fosforilación de las JNK. La función más importante de JNK es la fosforilación de *cJun*, que es un miembro de la familia de factores de transcripción AP1. La fosforilación en la serina 63 y la 73, son fundamentales para la activación transcripcional de *cJun* (Li et al., 2004). Los genes diana de estos factores se encuentran principalmente relacionados con el ciclo celular y la apoptosis. Modelos genéticos en ratones han permitido ver que la ablación de JNK confiere resistencia a la quimioterapia y la radiación UV (Wada and Penninger,

2004). JNK también interacciona con ATF1, ELK1, STAT3 y p53 (Bogoyevitch and Kobe, 2006). Observaciones recientes han demostrado cómo JNK estaría relacionado con el desarrollo de la resistencia a insulina y su unión deficiente al receptor. La fosforilación del receptor sustrato de la insulina- 1 (IRS- 1, Insulin Receptor Substrate) en la serina 307 por JNK 1/2 ha demostrado ser posiblemente una de las causas de una unión deficiente de la insulina a su receptor, bloqueando la señal de la insulina (Aguirre et al., 2002). Además, JNK está relacionado también con la activación de TNF $\alpha$ , secretado por adipocitos, junto con esto, la fosforilación de IRS-1 por JNK sugeriría un mecanismo involucrado en la resistencia a insulina en la obesidad (Hirosumi et al., 2002; Solomon et al., 2011; Uysal et al., 1997).

### *1.7.3 Módulo de p38*

La familia de las MAPK p38 incluye las isoformas p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , codificadas por distintos genes. p38 $\alpha$  y p38 $\beta$  se expresan en la mayor parte de los tejidos, mientras que p38 $\gamma$  y p38 $\delta$  tienen una expresión más específica de tejido. Estudios de ablación de las distintas isoformas en modelos genéticos de ratones, han sugerido funciones parecidas entre todas ellas, aunque la selectividad por los sustratos sea distinta (Cuenda and Rousseau, 2007; del Barco Barrantes et al., 2011). Las MAPK p38 también se ven activadas por citoquinas inflamatorias, estrés oxidativo, radiación UV e hipoxia (Cargnello and Roux, 2011). Las proteínas TRAF poseen actividad ubiquitina ligasa que activa a varias MAP3K implicadas en la ruta de las p38, entre las que se encuentran ASK1, MLK-3 y la quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TAK1, transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1) (Dolado et al., 2007). Estas MAP3K también se estimulan por el estrés oxidativo (Teramoto et al., 1996). Las MAPK p38 interactúan con varias proteínas sustrato, que se encuentran tanto en el citosol como en el núcleo (Trepolec et al., 2013). Estas dianas incluyen MAPKAPK que actúan sobre genes involucrados en la diferenciación celular, producción de citoquinas, ciclo celular y apoptosis (Zarubin and Han, 2005). Por otro lado, también se ha descubierto que induce la fosforilación de ATF6 y promueve su traslocación al núcleo, regulando también a GRP78, activándola, por lo que sugiere un papel en la regulación del estrés del RE (Bulavin et al., 1999).



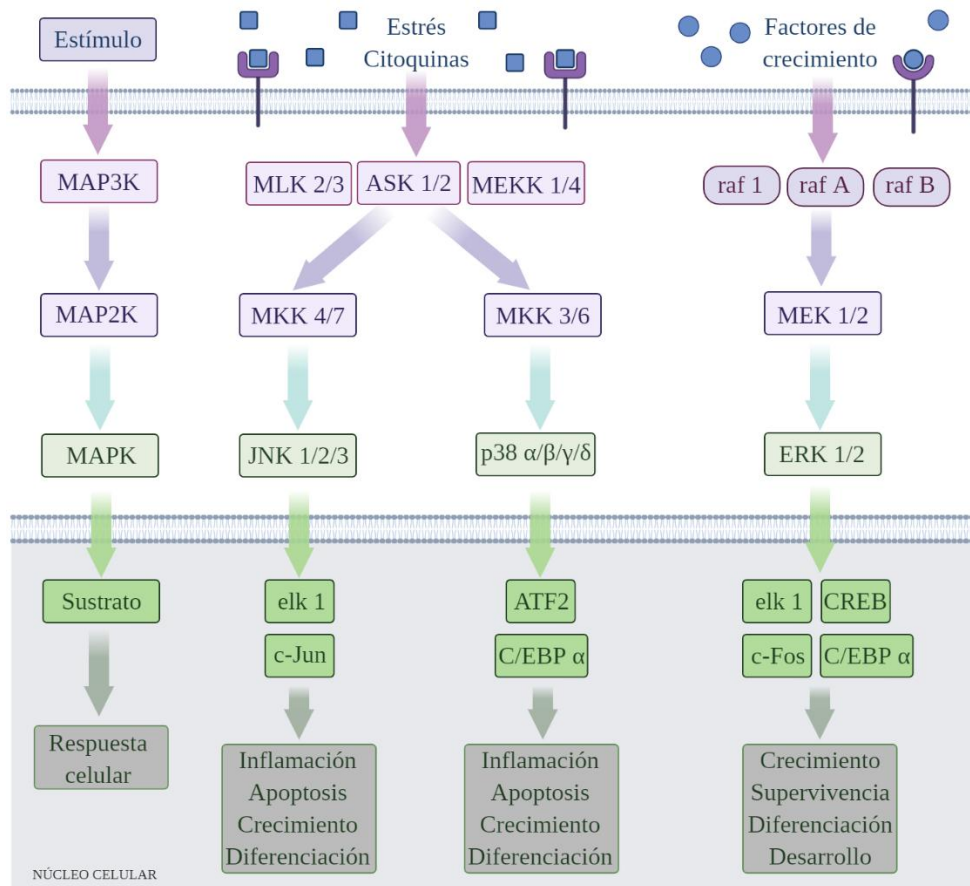


Figura 7. Rutas de regulación de MAPK. Creado con BioRender.com.

En lo que se refiere al tejido adiposo, las quinasas activadas por estrés juegan un papel bastante importante. En los adultos, el número de adipocitos permanece constante, pero la obesidad provoca que el tejido adiposo se expanda. Los procesos mediante los cuales esto puede ocurrir, son la hipertrofia de las células adiposas mediante el almacenamiento de ácidos grasos, y también la diferenciación de células precursoras hacia adipocitos, también llamado adipogénesis (Berry et al., 2014). El módulo de las MAPK p38 ha sido propuesto como un regulador de la adipogénesis (Rosen and MacDougald, 2006), se sabe que estimulan los estadios más tempranos de los fibroblastos para que se diferencien en adipocitos, sin embargo, la activación de p38 en estados más tardíos de la adipogénesis, se ha visto que promueve la apoptosis (Engelman et al., 1999; Engelman et al., 1998). En los fibroblastos embrionarios, la adipogénesis se ve incrementada por la inhibición química de p38, efecto que se asocia con la proteína de unión potenciadora de CAAT  $\beta$  (C/EBP $\beta$ , CCAAT Enhancer Binding Protein  $\beta$ ), resultando en su activación para después inducir la transcripción del receptor activado por la proliferación del peroxisoma  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ , Peroxisome Proliferator- Activated Receptor  $\gamma$ ), ambas con una importante función en la adipogénesis (Aouadi et al., 2006). Aún se necesitarían más estudios para conocer el papel de cada una de las isoformas de p38 en la adipogénesis. En lo que se refiere al tejido adiposo pardo, o BAT, la ruta de las MAPK p38 también forman parte de la regulación de la termogénesis y *browning*, en el caso del tejido adiposo blanco. Estudios recientes describen cómo la activación, a través de la fosforilación, de p38 actúan como activadores del *browning* en ratones (Cao et al., 2004). En este estudio, se ha comprobado cómo la isoforma p38 $\alpha$  funciona como un mediador en el incremento de UCP1 en el BAT durante la exposición al frío. Sin embargo, otros estudios posteriores en

modelos genéticos de ratones, en los que se inhibe la expresión de p38 $\alpha$  en el tejido adiposo, mostraron que se activa la termogénesis, sugiriendo que p38 $\alpha$  bloquea la termogénesis (Matesanz et al., 2018; Zhang et al., 2018). En uno de estos estudios, han comprobado que la sobreexpresión de p38 $\delta$  induce la estimulación del BAT, aumentando la termogénesis y el gasto energético (Matesanz et al., 2018). También existen estudios *in vitro* en los que la isoforma p38 $\delta$  en adipocitos marrones, se ve activada después de la estimulación de los receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos por la T3, mientras que aquellas células marrones que carecían de p38 $\alpha$  mostraron un aumento en la expresión de genes relacionados con el *browning* (Matesanz et al., 2018). Por otro lado, se ha demostrado también que la ablación de MKK6, activador de p38, promueve la obesidad controlando el *browning* y provoca la pérdida de la capacidad termogénica, debido a una disfunción mitocondrial (Matesanz et al., 2017). En el tejido adiposo blanco, p38 $\alpha$  se ve activado por una ruta alternativa que involucra a AMPK, la quinasa activada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  1 (TAB1, TGF- Beta Activated Kinase 1) y TAK1. La activación de p38 $\alpha$  aumenta el *browning* bajo los efectos de la T<sub>3</sub>, y la consecuente expresión de UCP1. MKK6 podría entonces considerarse como una diana terapéutica en el tratamiento de la obesidad. Estudios en humanos, se correlacionan con estos hallazgos, ya que se ha visto una relación de la MAPK14 con la expresión de UCP1 en el WAT, que se correlaciona de forma inversa con el índice de masa corporal (Matesanz et al., 2018).

Los mecanismos de acción de las MAP quininas JNK ha sido ampliamente estudiados mediante la generación de modelos genéticos de animales, sin embargo, aquellos que rodean al módulo de las p38 están menos investigados, sobre todo en lo que se refiere a obesidad, diabetes y otras enfermedades metabólicas. Una de las cosas más importantes por dilucidar es la implicación de cada una de las isoformas de p38 dependiendo del tejido y cual es su papel en la modulación de las distintas señales de estrés. La mayor parte de estudios se desarrollan en el contexto de las isoformas p38 $\alpha$  y p38 $\beta$ , sin embargo queda más por ver sobre los mecanismos de fosforilación que implican a las isoformas p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ , ya que además, se tiende a asumir que la fosforilación de esta familia envuelve directamente a p38 $\alpha$ , y aunque históricamente se les ha atribuido la misma función a todas las isoformas, queda por dilucidar su papel de forma individual.

# HIPÓTESIS





## 2 HIPÓTESIS

Estudios recientes de nuestro grupo han demostrado que las neuronas del VMH desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis energética y metabólica. Aunque algunas de las vías de señalización, como AMPK, han sido estudiadas en detalle el papel de otras como MKK6 no ha sido explorado. En esta tesis, postulamos que MKK6 tendría un papel relevante en la regulación de la homeostasis energética, como formar parte de la vía de señalización a través de las cuáles algunas señales periféricas ejercen sus efectos biológicos en el SNC.





# OBJETIVOS







### 3 OBJETIVOS

-Esclarecer si MKK6 está implicada en la regulación de la homeostasis energética y metabólica en las neuronas del VMH, cuya relevancia en estos procesos es bien conocida.

-Dado que estudios previos del grupo han demostrado que las hormonas tiroideas influyen el gasto energético actuando en neuronas del VMH, decidimos estudiar si la ruta de la MKK6 está implicada en las acciones de las hormonas tiroideas sobre estas neuronas.





# MATERIALES Y MÉTODOS





## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 MODELOS ANIMALES

#### 4.1.1 Legislación

En materia de experimentación animal, cabe destacar que los procedimientos de experimentales y de manipulación de animales efectuados durante la realización de esta tesis, han sido siempre los contemplados dentro del marco de actuación que permite el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela, siendo responsable Miguel Antonio López Pérez con los números de procedimiento ID 15005AE/10/FUN/FISIO2/MLP2 , ID 15010/14/006 e ID 15012/2020/010 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. En todos los procedimientos o manipulación realizados durante el desarrollo de esta tesis se ha respetado lo marcado en el artículo 4 de este real decreto, que trata principalmente sobre los principios de reemplazo, reducción y refinamiento. Esto implica emplear el número mínimo de animales posible en cada experimento evitando la repetición, dentro de lo posible en la consecución de los objetivos de cada situación experimental. En consonancia con lo anterior, se ha buscado siempre mantener el bienestar animal evitando el estrés y sufrimiento al máximo.

#### 4.1.2 Modelos animales

Los modelos animales utilizados en la realización de esta tesis son los que siguen:

1-Ratón macho de la cepa MKK6 LoxP (B6.129-Map2k6tm1Flv) con un peso medio de 26-30 gramos y una edad de entre 8 y 12 semanas (Matesanz et al., 2017).

Las condiciones de estabulación de los animales fueron una temperatura estable, de  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclos de luz-oscuridad de 12 horas (8:00 horas-20:00 horas). Antes de cada procedimiento se ha realizado un período de aclimatación de aproximadamente 7 días.

Durante el tiempo de aclimatación y experimentación los animales se han mantenido con alimento *ad libitum* tanto con 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) o dieta alta en grasas (HFD, *high fat diet*) (Ref. D12492: 60% fat, 20% carbohydrates, 20% proteins, 5.21 Kcal/g; Research Diet Inc, New Brunswick, NJ), y agua. De forma diaria se monitorizaron distintos parámetros, como la masa corporal y la ingesta, indicativos ambos del bienestar de los animales. Las mediciones se han realizado con una balanza de precisión durante todo el tiempo de experimentación.

En cuanto a las condiciones de estabulación, los animales fueron mantenidos individual o colectivamente, dependiendo de los requerimientos del procedimiento en cada caso. En los procedimientos en los que se ha necesitado medir tanto el peso corporal como la ingesta, los animales se han mantenido individualizados como máximo de una semana a diez días.

## 4.2 ANESTESIA Y ANALGESIA

Antes de comenzar cada uno de los procedimientos quirúrgicos, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de anestesia general. En rata se inyectó 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), por lo tanto la dosis fue de de 200µl/100g de masa corporal. En ratones la composición de la anestesia fue de de 13,8% de ketamina, 3,45% de xilacina y 82,75% de suero salino, siendo la dosis 100 µl/10g de masa corporal. En cada caso, para verificar el estado de anestesia de los animales, se comprobó el reflejo podal y palpebral, puesto que la pérdida de estos reflejos indica un profundo estado de anestesia durante el cual se pueden realizar los procedimientos quirúrgicos.

Como método de analgesia, todos los animales recibieron keprofeno (*ketoprofeno-Orudis 100 mg*, Sanoli aventis, Barcelona, España) por vía subcutánea (SC). La dosis considerada en todos los procedimientos fue de 2,5 mg/Kg de masa corporal.

### 4.2.1 Vías de administración de sustancias

#### 4.2.1.1 Vía subcutánea (SC)

La zona por la cual se accede para realizar este tipo de inyecciones es de forma lateral, encima de cualquiera de las patas traseras. Con los animales sin anestesia, se inmovilizan tapándoles los ojos con un trapo, con la mano con la que inmovilizamos, pellizcamos en el lomo y con la otra mano se realiza la inyección con una 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) colocándonos paralelamente a la columna vertebral. Este procedimiento no requiere de anestesia y se puede emplear de forma continuada durante varios días.

#### 4.2.1.2 Vía Intraperitoneal (IP)

Esta inyección se realiza a través del peritoneo, en la zona ventral caudal del animal, cerca de la pata. La parte posterior del animal debe estar inmovilizada para evitar daños debido al movimiento del animal, en el caso de la rata se oprimen también las extremidades anteriores y se inmoviliza la zona inferior del cuerpo sujetando la cola. Se recomienda inclinar ligeramente el animal hacia abajo para que se desplacen ligeramente los órganos internos por su propio peso y evitar desgarrarlos. La jeringa jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-*

*sterile*, BD Medical Surgical Systems) se acopla a una aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm*, BD Medical Surgical Systems) que se introduce de forma casi perpendicular al cuerpo del animal.

Esta vía de administración se puede realizar sin anestesia para inocular sustancias. Es nuestra vía de elección para anestesiarse a los animales (dosis detallada en la sección anterior).

#### 4.2.1.3 Vía hipotalámica núcleo-específica

Estavía se utiliza principalmente para la administración de sustancias en núcleos hipotalámicos específicos mediante el uso de unas coordenadas especificadas para cada especie (C, 2013). Como punto de referencia se utiliza el bregma, que sería la intersección de la sutura coronal con la sagital perpendicularmente. A partir de ahí se calculan las coordenadas antero-posterior (AP), lateral (L) y dorso-ventral (DV), siendo diferentes dependiendo del núcleo al que queremos acceder. La inoculación de las sustancias se hace en ambos hemisferios. Las coordenadas de los núcleos estudiados son las siguientes:

-VMH en ratón: -2,85 mm AP;  $\pm 2$  mm L; 8,1 DV.

Para realizar este procedimiento se utiliza un aparato estereotáxico (*David Kopf Instruments*, Tujunga, CA, EEUU) (más detallado en Procedimientos quirúrgicos). Posteriormente, se calculan las coordenadas teniendo en cuenta el núcleo que queremos inocular, que para ello se utilizan jeringuillas de microinyección (*Hamilton, Serie 700, modelo 7001, 1 $\mu$ l calibre 25*; Reno, NV, EEUU). Se inyecta 1 $\mu$ l por pinchazo con un flujo de 200 nl/min durante 5 minutos, y con una concentración de virus adeno-asociado (AAVs, *adeno-associated virus*) de  $1 \times 10^9$  copias/ $\mu$ l. (Martins et al., 2016; Romero-Pico et al., 2018).

#### 4.2.1.4 Vía intracerebroventricular (ICV)

Esta vía se emplea para la inyección de sustancias a través de una cánula que se encuentra fija al cráneo del animal y que llega al ventrículo lateral del animal. El flujo del líquido cefalorraquídeo llega al tercer ventrículo (detallado en procedimientos quirúrgicos). En el caso del ratón con la ayuda de un trazo se inmoviliza el cuerpo del animal, agarrando con una mano sin apretar y dejando la cabeza fuera. Se corta la punta de la cánula que se encuentra sellada, y se inyecta la sustancia introduciendo una jeringuilla (*Model 1702N 22s*, Hamilton, Reno, NV, EEUU) en el interior de la cánula y desplazando el émbolo con cuidado, para que el líquido se introduzca lentamente. Este procedimiento requiere de anestesia para la implantación de la cánula, las inyecciones de sustancias se pueden realizar con el animal despierto. Puede repetirse durante varios días consecutivos.

### 4.3 PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

#### 4.3.1 *Monitorización de la ingesta y de la masa corporal*

Para el registro de la masa corporal y la ingesta se utilizó una balanza de precisión (*Balanza de precisión PS 4500.R1.M*, RADWAG, Radom, Polonia). Las medidas se realizaron de forma diaria durante la duración de los distintos tratamientos, siempre en la misma franja horaria (entre las 17:00 y las 19:00 horas) y con los animales estabulados de forma individual.

### 4.3.2 Monitorización del gasto energético, coeficiente respiratorio y actividad locomotora

Para este procedimiento se ha utilizado un sistema de calorimetría indirecta, compuesto por jaulas en las que los animales se estabulan individualmente. El sistema incorpora en cada caja unos sensores de registro del gasto energético (EE, *energy expenditure*) y el coeficiente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*), a partir de los valores medidos de consumo de O<sub>2</sub> (vO<sub>2</sub>) y producción de CO<sub>2</sub> (vCO<sub>2</sub>); y la actividad locomotora (LA, *locomotor activity*) (*LabMaster*; TSE Systems; Bad Homburg, Alemania).

El sistema de calorimetría está calibrado a partir de unos gases de referencia (20,9% O<sub>2</sub>; 0,05% CO<sub>2</sub> y 79,05% N<sub>2</sub>) con temperatura controlada (24°C) en la que se bombea el aire. La tasa metabólica se midió durante 24-48h. El EE, RQ (VCO<sub>2</sub>/VO<sub>2</sub>) y la LA se registraron cada 30 min. Antes de introducir a los animales en este sistema se adaptaron en unas cajas durante una semana.

### 4.3.3 Determinación de la composición corporal

Para el análisis de la composición corporal se hizo con un sistema de resonancia magnética nuclear (NMR, nuclear magnetic resonance) (*Whole Body Composition Analyzer*; EchoMRI; Houston, TX, EEUU). Con esta técnica se analiza la composición corporal del animal, calculando la cantidad de masa grasa y magra del animal. Para este procedimiento no es necesario anestesiarse al animal, que se introduce en un adaptador de su tamaño. El escaneado de cada medida se produce en un período de tiempo corto, se realizaron tres medidas entre las que se hizo la media para difuminar las variaciones debidas al movimiento del animal en el adaptador.

### 4.3.4 Test de tolerancia a glucosa e insulina

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

## 4.4 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

### 4.4.1 Canulación Intracerebroventricular

Las cánulas para este procedimiento se prepararon con 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) y 1,09 mm de diámetro exterior, 0,38 mm de diámetro interior (PE-20) para rata. Se corta uno de los extremos en bisel con un ángulo de 45° aproximadamente y con una longitud



de 0,5mm. A 2,5mm del bisel se coloca un tope para impedir que la cánula penetre a mayor profundidad de la deseada 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 para ratón y 3,5 cm para rata.

Después de administrar la anestesia a los animales, y comprobar su estado, se les practica un corte transversal de 1,5 cm en la piel de la cabeza, por delante de las orejas, perpendicular a la sutura sagital. Posteriormente, se separa el tejido que une la piel al cráneo para poder ver el bregma, que va a ser nuestro punto de referencia. Una vez identificado el bregma se realiza con cuidado una perforación en el cráneo con una broca quirúrgica a una distancia lateral de 1,2 mm de la sutura sagital y 0,6 mm posterior al bregma, en ratón, y 1,5 mm de la sutura sagital y 0,9 mm posterior al bregma en rata. La perforación se puede realizar tanto en el lado izquierdo como en el derecho, ya que en ambos lados se accede al ventrículo lateral. Una vez hecho lo anterior, se introduce la cánula por el lado biselado en el agujero y se fija al cráneo con un adhesivo de cianocrilato y se cierra la piel con cuidado. Para proceder a la administración de sustancias se debe dejar el animal en reposo durante 3-4 días.

#### 4.4.2 *Estereotaxia núcleo-específica*

Una vez anestesiados los animales y comprobar su estado, se colocan en un aparato estereotáxico (*David Kopf Instruments*, Tujunga, CA, EEUU). Una vez colocado el animal en el equipo, con la cabeza inmovilizada, se realiza un corte transversal en la piel de la cabeza, entre la altura de los ojos y de las orejas, raspamos el tejido subcutáneo para poder dejar accesible el bregma. Se calculan las coordenadas estereotáxicas estableciendo como referencia el bregma, dependiendo del núcleo al que queramos acceder en cada una de las dos especies, tendremos que calcularlas a partir de unas de referencia:

-En el caso de ratón: en el VMH se realizó una inyección en cada hemisferio cerebral siguiendo las siguientes coordenadas: eje antero-posterior: 1,7 mm; eje lateral: 0,5 mm; eje dorso-ventral: 5,5 mm.

El cráneo se perfora en cada una de las coordenadas calculadas, con una broca quirúrgica y se inyecta la sustancia. En cada inyección se inocula 1µl de sustancia con una jeringa (*Hamilton, Serie 700, modelo 7001, 1µl calibre 25*; Reno, NV, EEUU), durante 5 minutos, con una velocidad de administración de 200nl/min. Una vez terminada la inyección se sutura 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 estabulan individualmente.

#### 4.4.3 *Disección y extracción de tejidos*

Al terminar cada procedimiento, se procede al sacrificio y la disección de tejidos. La eutanasia se hizo por luxación cervical y decapitación, según las leyes y normas de experimentación animal. De cada animal se extrajo el hipotálamo, BAT, tejido adiposo blanco gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), sWAT y tejido adiposo blanco visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*). Los tejidos se han mantenido a -80°C para su posterior procesamiento y análisis. Para la extracción de núcleos concretos del hipotálamo se realizó una microdisección bajo una lupa óptica de 20 aumentos. Para los análisis inmunohistoquímicos e histológicos las muestras fueron fijadas en formalina al 10% y luego parafinadas.

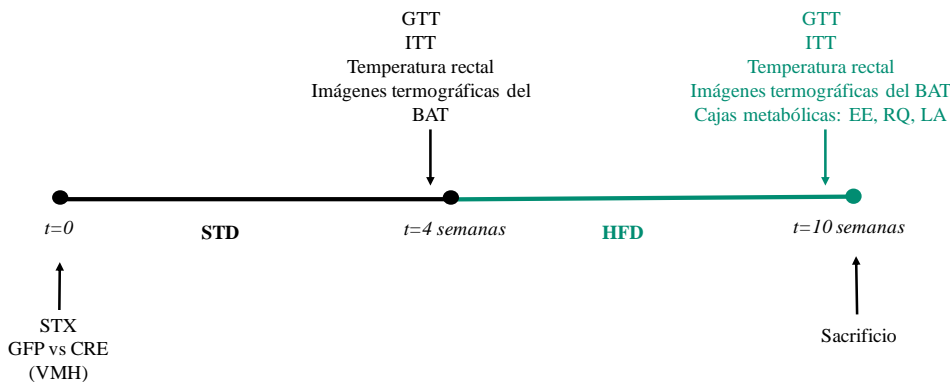
## 4.5 DISEÑOS EXPERIMENTALES

### 4.5.1 Inoculación de Adenovirus Asociados Cre en ratones MKK6 FLOX con STD y HFD

Para determinar el efecto de la inhibición de MKK6 en el VMH, después de una semana de adaptación de los animales tras su llegada al animalario, los ratones fueron divididos en 2 grupos (n=20) con acceso libre a comida STD, un grupo fue inoculado con adenovirus asociados que expresan la recombinasa CRE y el otro con GFP en el VMH. Durante ese período fueron estabulados individualmente. Al término de la fase luminosa se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente. Transcurridas 4 semanas, se procedió a realizar ensayos de tolerancia a glucosa e insulina monitorización de la temperatura corporal e imágenes del tejido adiposo pardo. Seguidamente, se sustituyó la comida STD por comida HFD (60% de las calorías provenientes de grasa, 5,21 kcal/g; Research Diet Inc, New Brunswick, NJ). Transcurridas 6 semanas se hicieron de nuevo ensayos de tolerancia a glucosa, insulina, toma de imágenes termográficas del BAT y temperatura rectal. Durante la última semana, se introdujeron los animales en cajas metabólicas para monitorizar el gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora. Al terminar cada procedimiento, se procede al sacrificio y la disección de tejidos. La eutanasia se hizo por luxación cervical y decapitación, según las leyes y normas de experimentación animal. De cada animal se extrajo el hipotálamo, BAT, tejido adiposo blanco gonadal (gWAT, *gonadal white adipose tissue*), tejido adiposo blanco subcutáneo (sWAT, *subcutaneous White adipose tissue*) y tejido adiposo blanco visceral (vWAT, *visceral white adipose tissue*). Los tejidos se han mantenido a -80°C para su posterior procesamiento y análisis. Para la extracción de núcleos concretos del hipotálamo se realizó una microdissección bajo una lupa óptica de 20 aumentos. Para los análisis inmunohistoquímicos e histológicos las muestras fueron fijadas en formalina al 10% y luego parafinadas.

Al final del ensayo se establecieron 4 grupos:

- STD GFP
- STD CRE
- HFD GFP
- HFD CRE



#### 4.5.2 Inoculación de Adenovirus Asociados Cre y T3 ICV en ratones MKK6 flox con HFD

Para determinar si la inhibición de MKK6 en el VMH en condiciones de DIO afectaba a la señalización por hormonas tiroideas, después de una semana de adaptación de los animales tras su llegada, fueron divididos en 4 grupos (n=40) con acceso libre a comida HFD (60% de las calorías provenientes de grasa, 5,21 kcal/g; Research Diet Inc, New Brunswick, NJ), dos grupos fueron inoculado con adenovirus asociados que expresan la recombinasa CRE y los otros con GFP en el VMH. Posteriormente, fueron estabulados individualmente. Al término de la fase luminosa se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente. Transcurridas 4 semanas, se procedió a realizar una canulación ICV para inocular T3 en una dosis de 8ng una vez al día durante 5 días. Los animales se dejaron en recuperación durante 2 o 3 días. Para la medición del gasto energético, el cociente respiratorio y la actividad locomotora, se introdujeron en cajas metabólicas. Previo a la finalización del experimento se procedió a la toma de imágenes termográficas del BAT y temperatura corporal.

Al final del ensayo se establecieron 4 grupos:

- HFD GFP Veh ICV
- HFD CRE Veh ICV
- HFD GFP T3 ICV
- HFD CRE T3 ICV



## 4.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 4.6.1 Análisis de proteínas por western blot

#### 4.6.1.1 Extracción de proteína

Para la extracción de proteína, se mantienen las muestras en hielo seco para su manipulación, después de la selección de un trozo para ser procesado, el resto sobrante se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El tejido seleccionado se introduce en un eppendorf de seguridad de 2ml (*Safe-Lock Tubes 2,0 ml*, Eppendorf, Hamburgo, Alemania), con una cantidad determinada de tampón de lisis para cada tejido (Tabla 1, tabla 2), generalmente se añade un volumen entre 200  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ , en el que anteriormente se diluyó una pastilla de inhibidor de proteasas (*Complete TM*, Roche, Mannheim, Alemania). En el mismo tubo se introduce una bola de acero. Durante todo este procedimiento se mantienen los tubos con las muestras y el tampón

de lisis en hielo. La homogenización se realiza en un homogenizador mecánico mecánico (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, EEUU) durante 4 min a 30Hz. Posteriormente, se centrifugan las muestras durante 30 minutos, y se extrae el sobrenadante, que se guarda en un tubo nuevo de 1,5 ml, descartándose el precipitado.

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

Tejido	Volumen
BAT	0,6/1 ml
Hipotálamo ratón	200 $\mu$ l

**Tabla 2. Composición tampón de lisis.**

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

#### 4.6.1.2 *Cuantificación de proteína*

Una vez obtenido el sobrenadante, a partir de él se preparan unas alícuotas que se van a utilizar para cuantificar la proteína existente en cada homogenizado. Las alícuotas que se preparan se componen de 10  $\mu$ l de muestra a lo que se le añade 250  $\mu$ l de agua destilada y se vortean. Se prepara una recta de calibrado con siete diluciones seriadas de albúmina de suero bovino (Tabla 3) (*BSA, Albumin, from bovine serum*, Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EEUU).

**Tabla 3. Concentración de BSA en cada punto de la recta de calibrado**

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

Estas alícuotas y diluciones se añaden en una placa de lectura para espectrofotómetro (*Multiskan Go Microplate Spectrophotometer*, Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) y se preparan cargando en cada pocillo 10  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la recta por duplicado y de las alícuotas de sobrenadante a los que posteriormente se les añade 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 preparada la placa, se introduce en el espectrofotómetro, se incuba 5 minutos a 37°C y se mide con una densidad óptica de 595 nm, las muestras que queden más oscuras van a tener más concentración de proteína y las más claras, menos. La cuantificación de la concentración de proteína de las muestras se empleó el software Magellan 6. Después de la medida, se procesan los datos obtenidos para cada muestra, que se extrapolan a los datos obtenidos para la recta patrón. Una vez determinada la cantidad de proteína de cada muestra se prepararon alícuotas a la concentración necesaria para cada análisis (10-20  $\mu$ g/16  $\mu$ l).

#### 4.6.1.3 *Western blot*

##### *Preparación de geles*

La separación de las proteínas se ha realizado utilizando geles de electroforesis de Tris/glicina SDS-Poliacrilamida, con distintas concentraciones de acrilamida. Antes de comenzar, se debe comprobar que las carcasas en las que se colocan los geles no pierden tampón de electroforesis. Seguidamente, se preparan los geles separadores (Tabla 4a, 4b). Una vez añadidos a los cristales donde se dejan polimerizar, se coloca isopropanol al 60%, para que los geles queden completamente rectos en la zona superior. Una vez gelificados, se elimina el isopropanol limpiando con agua destilada, se preparan los geles concentradores y se añaden por encima de los separadores (Tabla 5a). Antes de que se produzca la polimerización de estos geles concentradores, se colocan los peines para que queden formados los pocillos en los que posteriormente se va a cargar la muestra. Los peines se retirarán antes de la carga de muestra.

**Tabla 4a. Preparación gel separador de electroforesis.**

Gel separador de electroforesis de 6'5%	
H <sub>2</sub> O destilada	2,45 ml
Acrilamida/bisacrilamida (30%)	2,18 ml
Tampón A	5,06 ml
APS 10 %	56,2 $\mu$ l
TEMED	28,1 $\mu$ l

**Tabla 4b. Preparación gel separador de electroforesis**

	Gel 8%	Gel 10%	Gel 12%
H <sub>2</sub> 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 5a. Preparación gel concentrador de electroforesis.**

Gel concentrador para gel de 6,5%		Gel concentrador para gel de 8-10-12%	
H <sub>2</sub> O destilada	1,77 ml	H <sub>2</sub> 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
APS 10 %	25 µl	SDS 10 %	50 ml
TEMED	12,5 µl	APS 10 %	50 µl
		TEMED	4 µl

**Tabla 5b. 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 <sub>2</sub> O destilada hasta 1 l		Ajustar pH a 6,8 y H <sub>2</sub> O destilada hasta 1 l	

### *Preparación de muestras para electroforesis*

Una vez que se ha calculado la concentración de proteína en el espectrofotómetro, se hacen los cálculos pertinentes para que en cada pocillo se añada la misma cantidad de proteína (µg) (Tabla 6), tampón de carga (1X) (Tabla 7) y tampón de lisis con inhibidor de proteasas. Se carga cada pocillo del gel concentrador. Para cada tejido se ajusta la cantidad de proteína que se considere necesaria para realizar el análisis.

**Tabla 6. Proporción de proteína cargada en cada pocillo.**

Tejido	
VMH	10 µg
BAT	15 µg
Hipotálamo	10 µg

**Tabla 7. Tampón de carga 5X.**

Tampón de carga	
SDS	2 g
Trizma-base	8 ml
$\beta$ -mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 ml
Ajustar pH a 6,8 y H <sub>2</sub> O miliQ hasta 1L	

### *Electroforesis*

A la hora de separar las proteínas en los geles, antes de cargarlos, se colocan en las carcasas de electroforesis y se añaden 500 ml de tampón de electroforesis 1X (100ml de tampón de electroforesis 5X en 400 ml de agua destilada) asegurándose de que los geles quedan sumergidos en el tampón. Las muestras se incuban a 95°C durante 5 min y se cargan los pocillos con 16  $\mu$ l de muestra, dejando el primer pocillo libre para cargar 5  $\mu$ l de marcador de pesos estándar para gel (*Precision Plus Protein, cat 161-0374 Bio-Rad*). A la carcasa se le coloca la tapa que lleva los electrodos y que se conectan directamente a una fuente alimentación con un voltaje constante de 130V. Cuando el frente de migración de las proteínas llegue hasta casi el final del gel, se para la electroforesis, ya que de no hacerlo, la muestra se saldría del gel por la parte inferior de los cristales.

**Tabla 8. Composición del tampón de electroforesis 5X.**

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

### *Transferencia del gel de electroforesis a una membrana*

Una vez tengamos las proteínas separadas por su peso molecular, se deben transferir a un medio más fácilmente manipulable que un gel, en nuestro caso se han utilizado membranas de PVDF (*Polyvinylidene Fluoride Immobilon-P membrane*, Millipore, Burlington, MA, EEUU). Este procedimiento se conoce como transferencia. Para ello se prepara gel absorbente (*Extra thick Blot Paper*, Bio-Rad, EEUU) que se sumerge en tampón de transferencia 1X y se mantiene a ser posible en frío hasta que vaya a ser utilizado. Se cortan las membranas de PVDF de la medida deseada, un poco más grandes que el gel (9 x 6,5 cm) y se activan. Para que se produzca esa activación, se sumergen en metanol, agua y tampón de transferencia 1X, 5 minutos en cada una de los líquidos y por ese orden. Una vez realizado este proceso, se coloca el papel absorbente en el aparato de transferencia, luego se coloca la membrana de PVDF y sobre ella un gel y otra pieza de papel absorbente. De cada vez se debe aplastar cada componente un poco con un rodillo, para evitar que queden burbujas de aire que impidan el



paso de las proteínas a la membrana. Se cierra el equipo de transferencia (Trans-blot) y se conecta a una fuente de alimentación con un amperaje constante de 0,25 V durante 1,40 horas.

**Tabla 9a. Composición tampón de transferencia 5X.**

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

**Tabla 9b. Composición tampón de transferencia 1X.**

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

### *Inmunodetección*

Una vez terminada la transferencia se retiran las membranas y se deshecha el resto. Las membranas se bloquean en BSA al 3% (3g de BSA en 100ml de TBS-TWEEN durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, las membranas se cortan, aislando las proteínas que nos interesan y evitando cortarlas usando una guía de peso molecular. Luego se incubaba cada fragmento de membrana con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. El anticuerpo se diluye en BSA-TWEEN 1% y la incubación se realiza durante una hora en agitación a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

Cuando finalice la incubación con el anticuerpo primario, se retira y se realizan 3 lavados de 5 minutos en TBS-TWEEN 1% para eliminar el exceso de anticuerpo. Luego, se incubaba la membrana con un anticuerpo secundario, específico para el anticuerpo primario, durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se realizan de nuevo tres lavados con TBS-TWEEN 1% de 5 minutos cada uno.

**Tabla 10a. Composición TBS 10X.**

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

Tabla 10b. Preparación TBS-TWEEN.

TBS-TWEEN-20	
TBS 10X	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Ajustar H2O destilada hasta 1 l	

Tabla 11. Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones

Anticuerpo	Dilución	Proveedor	Referencia
Rabbit polyclonal Anti-Phospho-AcetylCoA Carboxylase (Ser79)	1:2000	Cell Signaling Technology	3661; RRID: AB_330337
Rabbit monoclonal Anti-AcetylCoA Carboxylase 1	1:1000	Merck Millipore	04-322; RRID: AB_673047
Rabbit monoclonal Anti-phospho-AMPK $\alpha$ (Trh172)	1:2000	Cell Signaling Technology	2535S; RRID: AB_331250
Rabbit polyclonal Anti-AMPK $\alpha$ 1	1:1000	Merck Millipore	07-350; RRID: AB_310542
Rabbit polyclonal Anti-AMPK $\alpha$ 2	1:1000	Merck Millipore	07-363; RRID: AB_310553
Mouse monoclonal Anti-Fatty Acid Synthase	1:1000	BD Biosciences	610963; RRID: AB_398276
Rabbit Anti-Phospho-IRE1 $\alpha$ (Ser724)	1:1000	Abcam	ab48187; RRID: AB_873899
Rabbit Anti-IRE1 $\alpha$ (14C10)	1:1000	Cell Signaling Technology	3294S; RRID: AB_823545
Rabbit Anti-Phospho-PERK (Thr981)	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-32577; RRID: AB_2293243
Rabbit monoclonal Anti-PERK (C33E10)	1:1000	Cell Signaling Technology	3192S; RRID: AB_2095847
Rabbit polyclonal to ATF6 beta	1:1000	Abcam	ab26085, RRID:AB_448977
Rabbit Anti-GRP78	1:1000	Cell Signaling Technology	3183S; RRID: AB_10695864
Rabbit Anti-Phospho-eIF2 $\alpha$ (Ser52)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-101670; RRID: AB_631364
Rabbit Anti-ATF6 $\alpha$ (H-280)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	sc-22799; RRID: AB_2242950
Rabbit polyclonal Anti-UCP1	1:10000	Abcam	ab10983; RRID: AB_2241462
Mouse monoclonal Anti- $\alpha$ -tubulin	1:5000	Sigma-Aldrich	T5168; RRID: AB_477579
Mouse monoclonal Anti- $\beta$ -Actin	1:5000	Sigma-Aldrich	A5316; RRID: AB_476743

Polyclonal Goat Anti- Rabbit inmunoglobulins/HPR	1:5000	Dako	P0448; RRID:AB_2617138
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse inmunoglobulins/HPR	1:5000	Dako	P0260; RRID:AB_2636929

### *Revelado*

Una vez tenemos las membranas incubadas, se realiza el revelado. Para ello, se debe preparar el sustrato de revelado (*Pierce ECL Western Blotting substrate*, Thermo Scientific) diluido 1:1. Se incuban las membranas en 1ml de ECL durante 4 minutos en oscuridad debido a la fotosensibilidad del sustrato. Posteriormente, se colocan los fragmentos de membrana en un casete (*Hypercassette*, Amersham biociencias GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido), situándolos entre papel de acetato transparente, evitando siempre que no queden burbujas entre la membrana y el acetato, ya que pueden interferir en la exposición. El revelado se realiza en una cámara con luz roja, ya que las películas de revelado son sensibles a la luz (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón). Se colocan las películas sobre el papel de acetato y se dejan exponer cerrando la tapa del casete. El tiempo de exposición varía para cada proteína, pero suele oscilar entre 30 segundos y varias horas. Un vez se considere que la exposición ha terminado, se introduce la película en una solución reveladora (dilución 1:10) (*Developer G150*, AGFA Healthcare NV) y seguidamente en solución fijadora (dilución 1:5) (*Manual fixing bath*, AGFA Healthcare NV). Finalmente, se retiran los restos de las soluciones de revelado con agua y se dejan secar las películas evitando tocar las zonas donde se encuentran las proteínas.

Antes de guardar los trozos de membranas del casete, se copian los marcadores de peso de las membranas en las películas secas, para dejar constancia de que las proteínas que se revelaron, han quedado en el peso indicado. Las membranas se conservan entre papel Whatman (*3MM Chromatography paper*, GE Healthcare 3030-931), ya que posteriormente se pueden volver a incubar con otros anticuerpos.

### *Cuantificación*

La cuantificación de las proteínas se realiza midiendo la densidad óptica de la señal de cada muestra, escaneando las películas secas y marcadas con el marcador y los grupos de (*resolución 400 ppp*, *CanonScan 9900F*, Canon, Tokio, Japón), con el software informático ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, EEUU). Una vez se obtiene el escaneo de cada proteína, se marca un rectángulo en ImageJ en el cual quepa cada uno de las bandas del mismo gel, ya que la densidad óptica de cada muestra debe ser analizada a partir del mismo área. Se miden todos los pocillos del gel y se toma una medida de una zona limpia de la película, para poder saber la densidad óptica del fondo y que se pueda corregir en cada pocillo analizado, restándose para obtener la intensidad de señal de cada banda del gel, que representa a cada una de las muestras. La señal de proteína en cada pocillo se representa en función de la señal obtenida para un control de carga, que suele ser  $\alpha$ -tubulina o  $\beta$ -actina dependiendo del tejido.

## 4.7 ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO POR PCR EN TIEMPO REAL

### *Extracción de ARN.*

Este procedimiento es necesario realizarlo manteniendo las muestras en hielo y realizando las centrifugaciones a 4°C. Para extraer el ARN se toma un trozo pequeño congelado del tejido de muestreo deseado, y se homogeniza de forma mecánica en 1 ml de Trizol (*TRIZOL Reagent*; Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) durante 3 min a 30Hz (*TissueLyser II*, Quiagen, Germantown, MD, EEUU). Posteriormente, se realiza un centrifugado de las muestras a 12000 rcf durante 10 min y se aspira la fracción intermedia. Esta fase se pasa a un tubo limpio de 1,5 ml y se le añaden 200 µl de cloroformo (*Chloroform*, Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU), se mezcla durante 15 segundos para homogenizar todo el contenido, ya que se queda separado en dos fases. Se deja reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga de nuevo a 12000 rcf durante 15 min.

El resultado de esta última centrifugación es una fase acuosa, que queda en la parte superior, y una fase orgánica en donde se quedan las proteínas y los lípidos, entremedias tendríamos otra fracción, que es donde se encuentra el ADN. El ARN se queda en la fase acuosa, la cual se aspira y se le añaden 500 µl de isopropanol y se homogeniza. El contenido, introducido en un tubo limpio, se deja reposar a -20°C durante 10 minutos para que precipite el ARN. Una vez acabado este tiempo, se vuelve a centrifugar durante 10 minutos a 12000 rcf. Una vez realizada la centrifugación se debe observar un pequeño precipitado blanco, que sería el ARN de interés. Se desecha el líquido y para limpiar el precipitado se le añade 1 ml de etanol (*Ethanol absolute PA*, Applichem/Pancreac, Darmstadt, Alemania) al 70% en agua DEPC y se mezcla. A continuación, se centrifuga de nuevo a 12000 rcf durante 5 minutos. Luego se elimina el sobrenadante y para que no quede rastro de etanol, se vuelve a centrifugar 1 minuto a 16000 rcf. Se pipetea el líquido que quede en el fondo. Finalmente, se resuspende el precipitado en agua DEPC y para que el ARN se disuelva, se calienta a 60 °C durante 10 min.

### *Cuantificación de ARN*

Una vez tenemos las muestras con el ARN, se procede a su cuantificación en un espectrofotómetro (*Nanodrop 2000*, Fisher Scientific, New Hampshire, EEUU) ajustado a dos longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorbancia de 260 nm nos da una idea de ácidos nucleicos que existen en la muestra, la de 280 nm indica la cantidad de proteína. Cuanto mejor haya sido la extracción que se ha realizado, el ratio 260/280 más se va a acercar a un valor de 2, indicando este número el mayor nivel de pureza de ARN. Cuando se obtiene el dato de la concentración de ARN, se preparan unas alícuotas de una concentración de 1 µg/µl (para WAT).

### *Retrotranscripción (RT)*

Debido a que el ARN no se puede amplificar de forma directa, debemos realizar un proceso de retrotranscripción (RT). El volumen total de cada muestra va a ser de 30 µl. En cada reacción de RT se prepara un control negativo sin muestra, que se sustituye por agua DEPC. Una vez preparado un tubo de reacción para cada muestra, se incuban en un termociclador. Finalmente, se mantienen las muestras congeladas a -20°C hasta su uso si no se van a emplear próximamente.

Tabla 12. Programa para RT

Programa RT	
50 min	37 °C
15 min	42°C
5 min	95°C

Cada reacción de RT contiene los siguientes componentes:

- 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*, 10 mM cada uno) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 1,5 µl Mg<sub>2</sub>Cl 50 mM (*Mg<sub>2</sub>Cl 50 mM*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,17 µl de Random primers (*Random primers*, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 0,25 µl inhibidor de ARNasas (*RNaseOUT*, 40 U/µl Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- 1 µl de M-MLV enzima reversotranscriptasa (*M-MLV*, 200 U/µl, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).
- Ajusta al volumen final con agua DEPC (agua destilada con dietilpirocarbonato al 0.1%. Se deja incubar a temperatura ambiente una noche) para un volumen final de 30 µl.

#### PCR en Tiempo Real (TaqMan)

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

Los componentes de cada una de las reacciones de la PCR en tiempo real fueron:

- 2,92 µl H<sub>2</sub>O-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 de RT.

Las muestras se cargan por duplicado en una placa adaptada para el aparato de Tiempo Real (*7500 Real Time PCR System*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU). Además de las muestras de ARN, se carga también una curva patrón para cada gen de interés, el control negativo de la RT y un blanco para la reacción de Taqman. La curva patrón consta de 6 puntos de diluciones seriadas (1:4) de las muestras de RT (2µl de RT de cada muestra, siempre de los tratamientos o tejidos que se quieran comparar). Para cada análisis de cada RT, se carga también una placa con un gen de referencia, en nuestro caso fue Hprt (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa). En la se especifican los primers y sondas que se utilizaron para la PCR en tiempo real.

Tabla 13. Primers y sondas para RealTime PCR.

ARNm	GenBank		Secuencia
<b>Cidea</b> ( <i>mouse</i> )	NM_00770 2.2	Sentido	5'-CCTACGACATCCGATGCACAA-3'
		Antisentido	5'-TCTGTGCAGCATAGGACATAAACC-3'
		Sonda	FAM-5'-CTTCAAGGCCGTGTTAAGGAATCTGCTG-3'- TAMRA
<b>Hprt</b>	NM_01258 3	Sentido	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		Antisentido	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCATCAC-3'
		Sonda	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'- TAMRA
<b>Ppargc1a</b>	NM_03134 7	Sentido	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		Antisentido	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3'
		Sonda	FAM-5'- AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA-3'-TAMRA
<b>Ppargc1b</b>	NM_17607 5.2	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00598552_m1
<b>Prdm16</b>	NM_00117 7995.1	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Mm01266512_m1

Tabla 14. Programa del termociclador Taqman.

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

## 4.8 TINCIÓN OIL-RED-O

Esta tinción se realiza en secciones de hígado congeladas. En un criostato se realizan cortes de un grosor de 10 µm. Se fijan las muestras toda la noche en formalina neutra tamponada al 10%. Posteriormente, se tiñen con Solución Oil Red durante 20 minutos (Oil red color solution, Merck) y se lavan con agua destilada. Se sumergen en otro colorante y se contratiñen con hematoxilina de Harris durante 10 minutos (Hematoxilina de Harris, Bio-optica). Se vulven a lavar con agua destilada y se montan con un medio de montaje acuoso. Una vez fijadas las muestras al porta, se realizan fotos en un microscopio conectado a una cámara Olympus XC50 (*Olympus Corporation*; Tokyo, Japón), con aumentos al 20x y 40x. Finalmente, las fotos fueron procesadas con el programa ImageJ (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, USA).



## 4.9 ESTADÍSTICA

Todos los datos generados tanto de los procedimientos *in vivo*, se presentan como porcentaje en función de su control. Se toma la media y el error de la media (SEM) ( $\text{media} \pm \text{SEM}$ ).

En las mediciones de la ingesta de los animales y de su masa corporal, los datos se expresan en bruto. El tamaño muestral de cada grupo experimental se especifica en los pies de figura de los resultados. Para analizar los resultados se excluyeron las muestras y/o animales atípicos realizando 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 homocedasticidad, y para ello se utilizó el test Shapiro-Wilks (Kao and Green, 2008). En el caso de que las poblaciones analizadas mostraran una distribución normal se realizarían test estadísticos paramétricos. El paquete estadístico empleado para llevar a cabo dichos análisis fue *Graphpad Prism 8.0*.

### 4.9.1 Test paramétricos

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

#### 4.9.1.1 Test T de Student

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).



# RESULTADOS

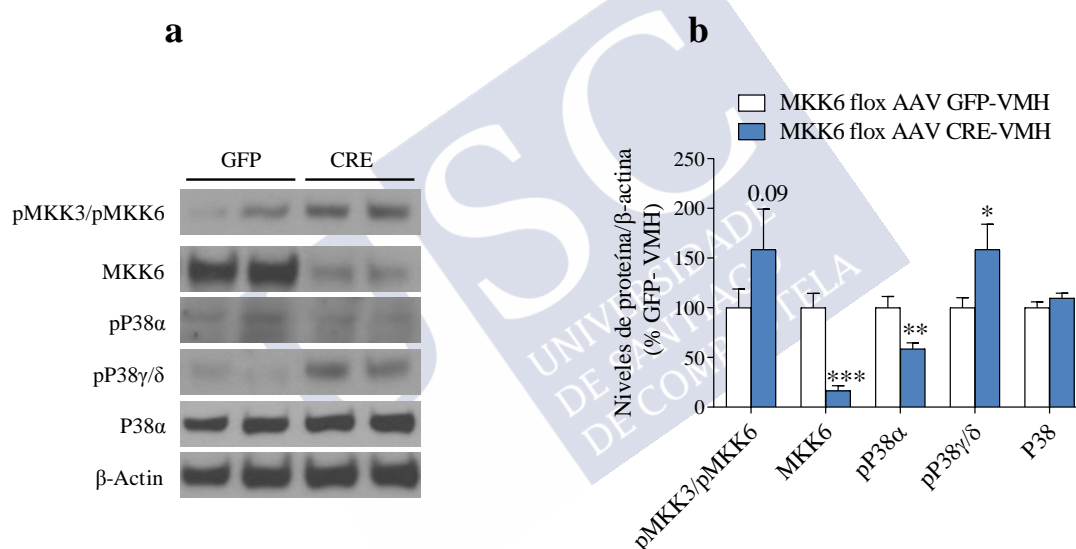




## 5 RESULTADOS

### 5.1 MKK6 EN EL VMH NO AFECTA AL BALANCE ENERGÉTICO

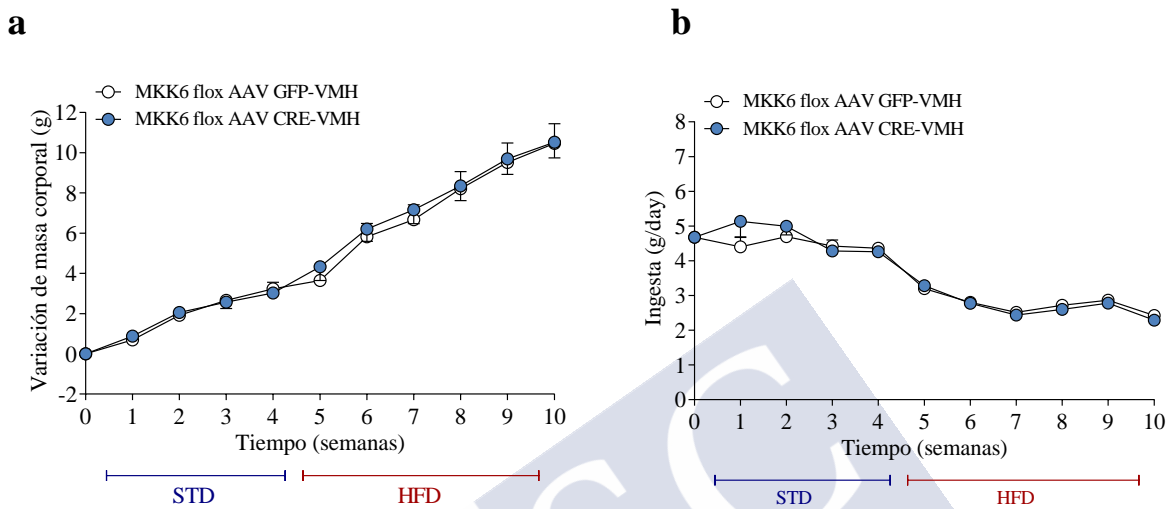
Para dilucidar los efectos de la inhibición de MKK6 en el VMH sobre el balance energético, en animales MKK6 flox inyectamos estereotáxicamente virus que sobreexpresaban la encima CRE recombinasa. Los ratones fueron alimentados durante 4 semanas con dieta STD y durante otras 6 con dieta HFD. Una vez obtenidos los resultados *in vivo* de la inhibición de MKK6 en el VMH, se analizó la expresión de MKK6 y de pp38 para comprobar se encontraban reducidos. Los resultados mostraron unos niveles significativamente más bajos de MKK6 y de pp38 $\alpha$ , sin embargo se vio un incremento de pp38 $\gamma/\delta$  y de las formas fosforiladas de MKK3 y MKK6 (Fig. 8 a y b). El aumento de las isoformas pp38  $\gamma/\delta$ , así como de las formas fosforiladas de MKK3, podrían ser debido a una compensación en la ruta, producida al inhibir la expresión de MKK6.



**Figura 8.** Efecto de la microinyección de AAV CRE en el VMH de ratones MKK6 flox. (a) niveles proteicos de pMKK3/pMKK6, MKK6, pP38 $\alpha$ , pP38 $\gamma/\delta$  y P38 (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=7, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=7) de ratones MKK6 flox tratados con AAV CRE. Test t-student (2 cola), \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.01 vs. GFP VMH. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM. Las bandas de los geles han sido cortadas del mismo gel original.

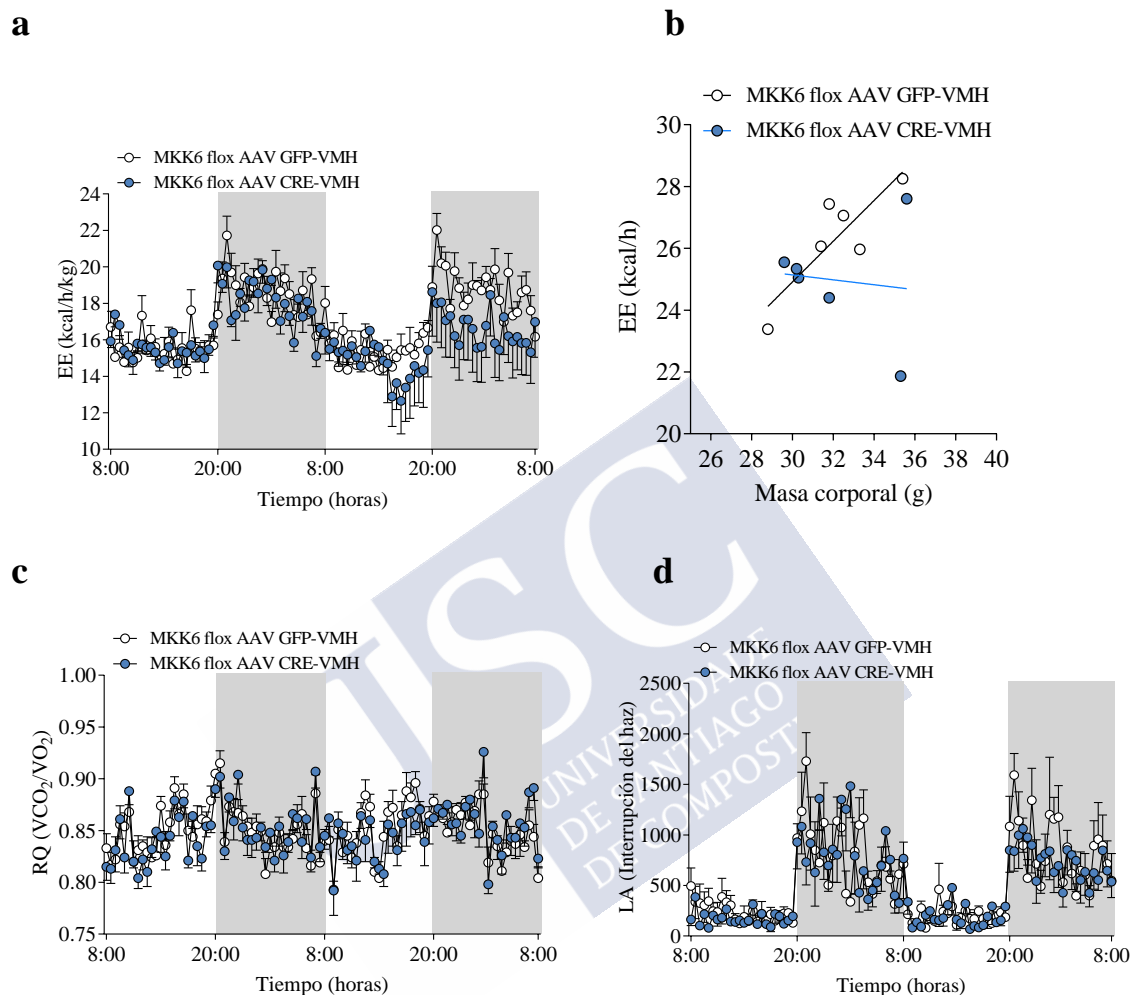
### 5.1.1 MKK6 en el VMH no afecta al peso, ingesta o gasto energético

La inhibición virogenética de MKK6, no indujo cambios diferenciales en la masa corporal o la ingesta de los animales tratados frente a sus controles, ni en STD ni en HFD (Fig. 9 a y b), lo que nos indicó que la inhibición en la expresión de MKK6 no era relevante en la variación de peso corporal ni la ingesta en las condiciones descritas.



**Figura 9.** Efecto de la microinyección de AAV CRE en el VMH en el VMH de ratones MKK6 flox. (a) Variación de masa corporal (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE- VMH n=10), (b) ingesta semanal (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE- VMH n=10) de ratones tratados con adenovirus asociados que expresan GFP o CRE. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

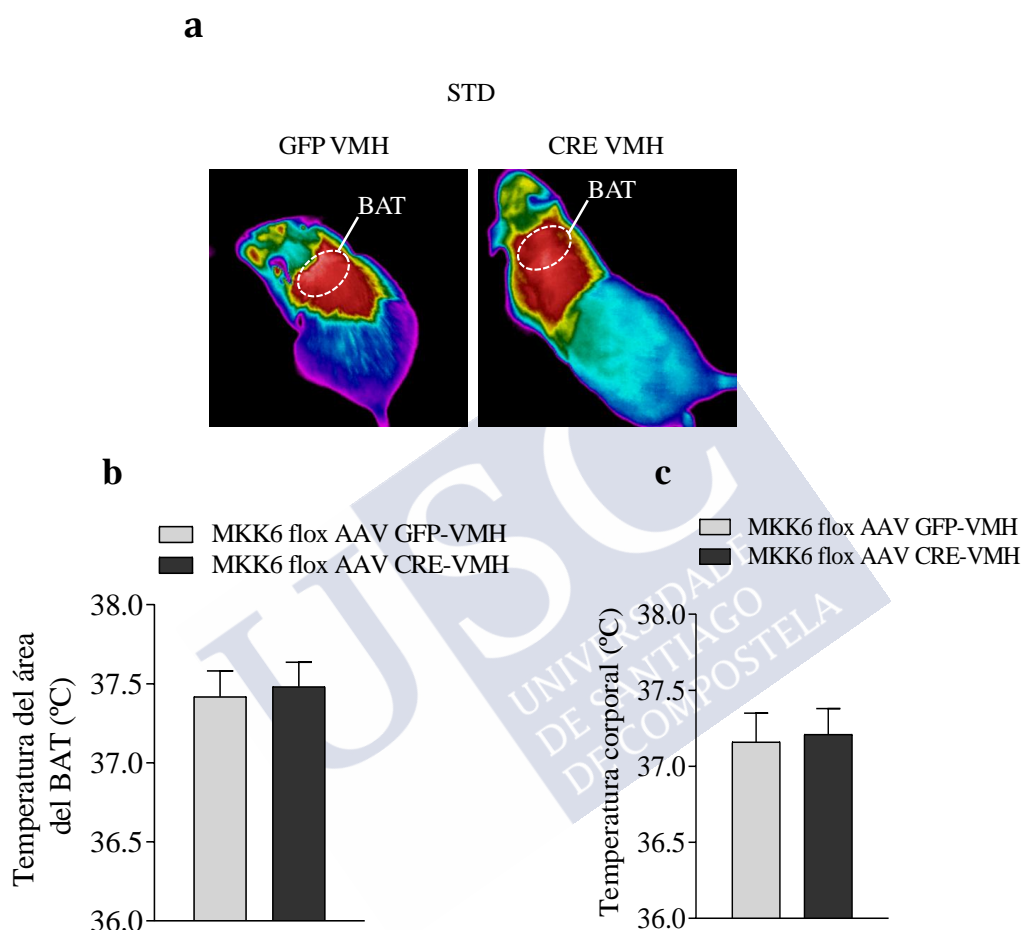
En vista de los resultados anteriores y para completar el fenotipado metabólico de los animales, se comprobó el estado del gasto energético en los dos grupos con dieta HFD. Los parámetros analizados han sido el gasto energético, la actividad locomotora y el cociente respiratorio (RQ, *respiratory quotient*). El RQ está relacionado de forma directa con el sustrato metabolizado en el organismo en un determinado momento, y su valor oscila entre 0.7 y 1 según se estén metabolizando lípidos o carbohidratos. Los datos no mostraron ningún cambio de los animales tratados con la recombinasa frente a sus controles GFP (Fig. 10 a-d).



**Figura 10.** Efecto de la microinyección de AAV CRE en el VMH sobre el gasto energético en ratones **MKK6 flox**. (a) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=12, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=12), (b) Gasto energético, EE en relación a la masa corporal (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=12, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=12) (c) actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=12, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=12) y (d) cociente respiratorio, RQ (*respiratory quotient*) (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=12, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=12) de ratones tratados con GFP o CRE. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

### 5.1.2 *MKK6* en el VMH no afecta a la termogénesis

Análisis más exhaustivos, mostraron que la inhibición de *MKK6* en el VMH no indujo cambios en los ratones alimentados con dieta STD en la función del BAT (Fig. 11 a y b). Tampoco se observaron diferencias en lo que se refiere a la temperatura corporal (Fig 11 c).



**Figura 11. Efecto de la microinyección de AAV CRE en el VMH en la termogénesis del BAT en ratones *MKK6* flox.** (a,b) Temperatura del área del BAT en ratones *MKK6* flox tratados en el VMH con adenovirus asociados sometidos a STD (*MKK6* flox AAV GFP-VMH n=10, *MKK6* flox AAV CRE-VMH n=10 y (c) Temperatura corporal de los ratones sometidos a STD (*MKK6* flox AAV GFP-VMH n=10, *MKK6* flox AAV CRE-VMH n=10). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. *MKK6* flox AAV GFP-VMH.

También se analizó la función termogénica del BAT en los animales alimentados con HFD. Los resultados obtenidos tampoco mostraron cambios significativos, ni en la temperatura del área del BAT (Fig 12 a y b) ni en la temperatura corporal (Fig 12 c).

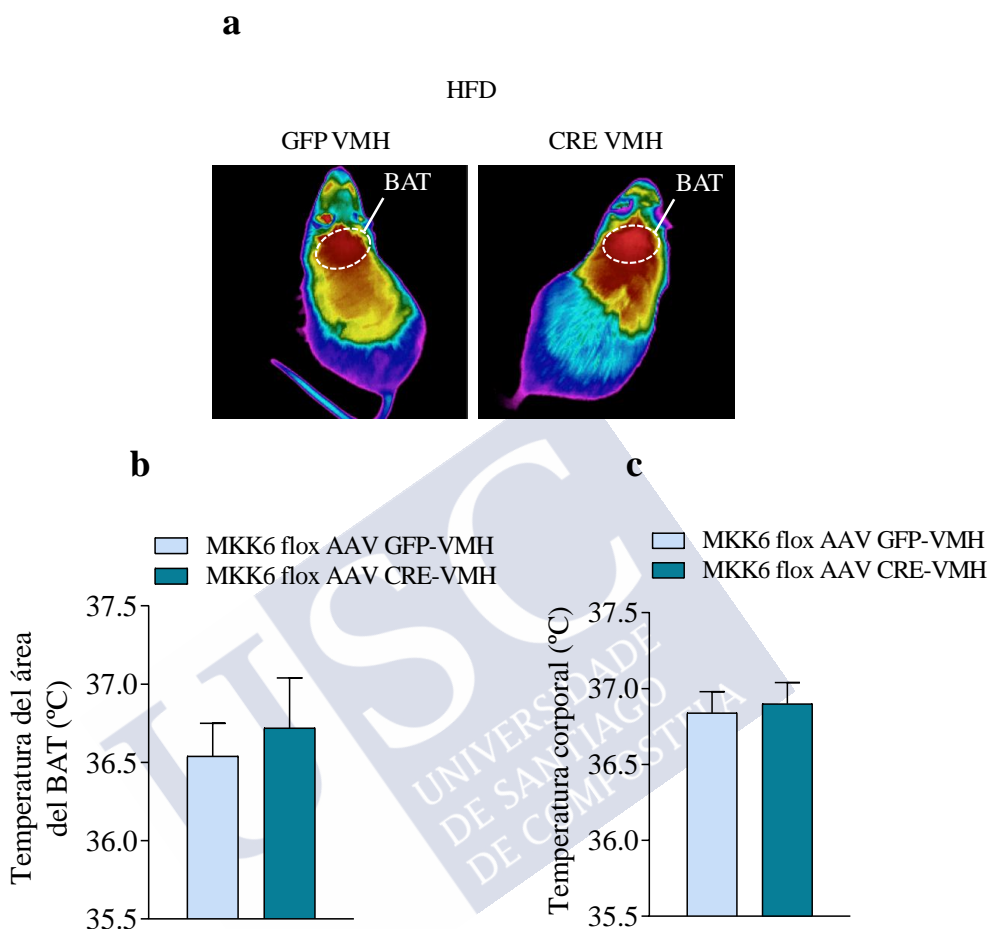
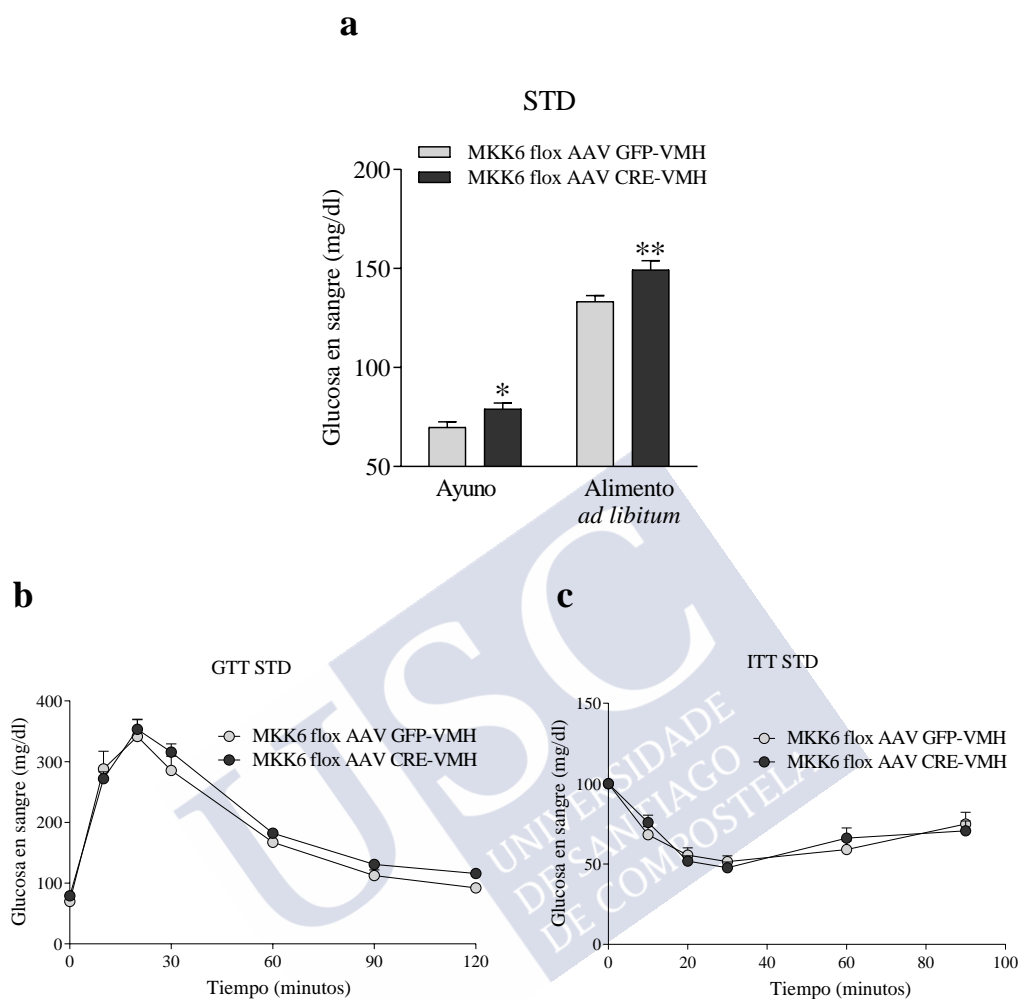


Figura 12. Efecto de la microinyección de AAV CRE en el VMH en la termogénesis del BAT en ratones MKK6 flox. (a,b) Temperatura del área del BAT en ratones MKK6 flox tratados en el VMH con adenovirus asociados sometidos HFD (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10) y (c) Temperatura corporal de los ratones sometidos HFD (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

## 5.2 MKK6 EN VMH Y LA REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA

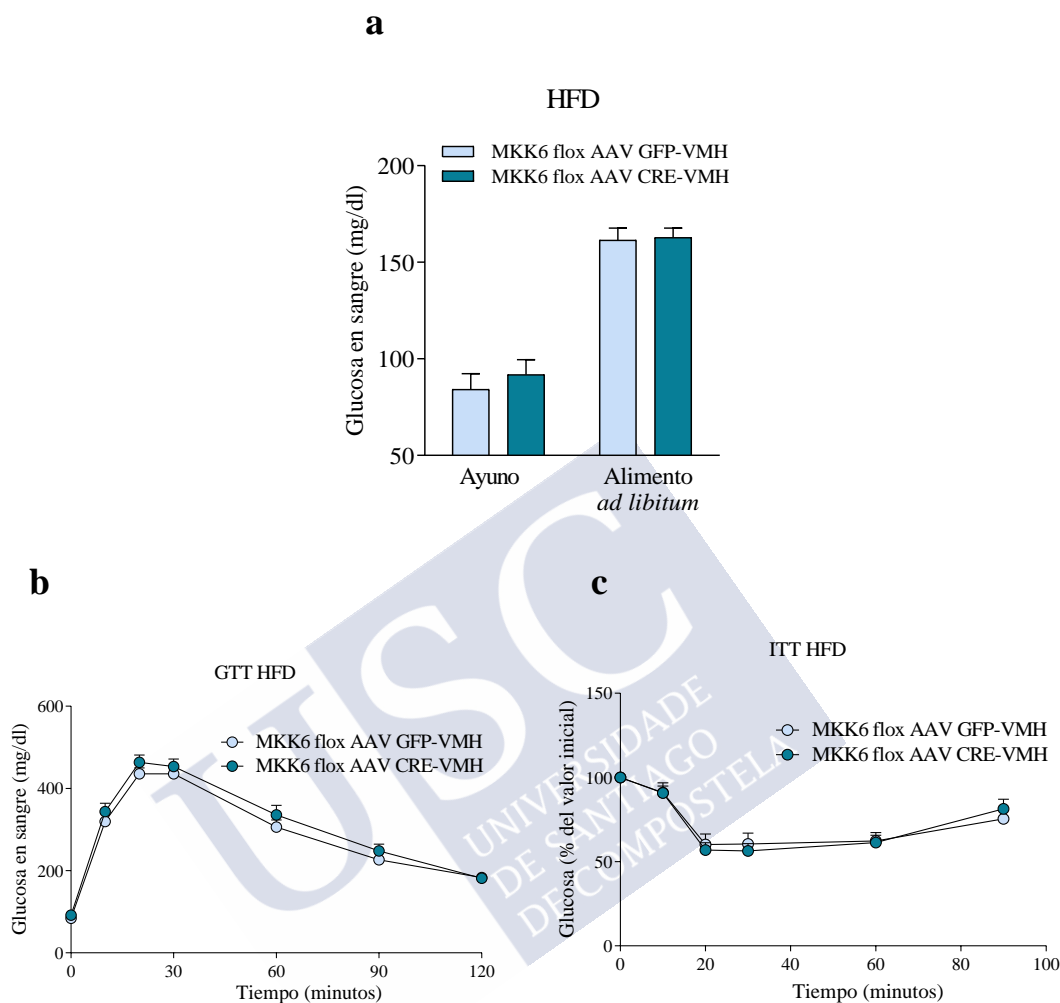
En lo que se refiere a la homeostasis periférica de la glucosa, los resultados mostraron un aumento en la glucosa basal de los animales microinyectados con AAVs codificantes de CRE en STD, tanto en ayuno como con alimento *ad libitum* (Fig 13 a). Sin embargo, en los ensayos de tolerancia a glucosa e insulina no se observó ningún cambio en la glucemia (Fig 13 b y c). Estos datos nos sugirieron que la inhibición de MKK6 en el VMH probablemente influya sobre la homeostasis basal de la glucosa en condiciones STD.





**Figura 13. Efecto de la eliminación de MKK6 en el VMH en la homeostasis de la glucosa en ratones STD y HFD.** (a) Niveles de glucosa circulantes en ratones MKK6 flox tratados en el VMH con adenovirus asociados sometidos a STD (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10), (b) test de tolerancia a la glucosa (STD: MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10), (c) test de tolerancia a la insulina (ITT, *insulin tolerance test*) (STD: MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10). Los datos están expresados como media±SEM. Test t-student (2 colas),\*\*P<0.01 vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

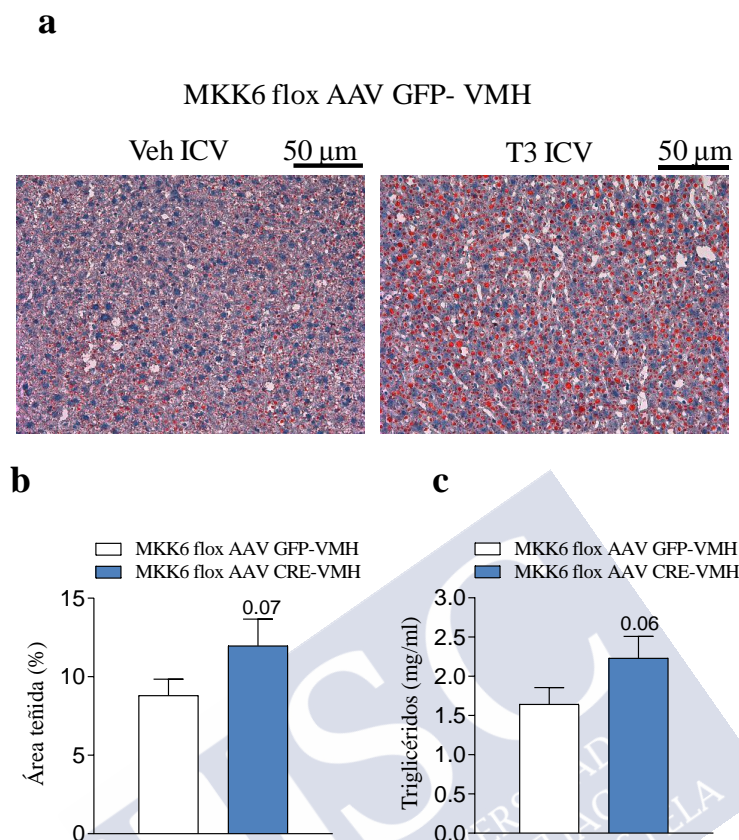
En el caso de los animales alimentados con HFD, el tratamiento AVV codificantes de la CRE recombinasa no indujo ningún tipo de cambio significativo en los niveles basales de glucosa, ni en ayuno ni *ad libitum* (Fig 14 a). Tampoco se han visto variaciones al someter a estos grupos de animales a ensayos de tolerancia a glucosa o insulina (Fig 14 b y c). Por lo tanto, podemos decir que en condiciones de obesidad inducida por dieta, la inhibición de MKK6 en el VMH no fue relevante en lo que se refiere al metabolismo periférico de la glucosa.



**Figura 14. Efecto de la eliminación de MKK6 en el VMH en la homeostasis de la glucosa en ratones STD y HFD.** (a) Niveles de glucosa circulantes en ratones MKK6 flox tratados en el VMH con adenovirus asociados sometidos a HFD (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10), (b) test de tolerancia a la glucosa HFD: (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10), (c) test de tolerancia a la insulina (ITT, *insulin tolerance test*) HFD: (MKK6 flox AAV GFP-VMH n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH n=10). Los datos están expresados como media $\pm$ SEM. Test t-student (2 colas).

### 5.3 MKK6 NO AFECTA A LA LIPOGÉNESIS HEPÁTICA

Finalmente, se decidió comprobar si en nuestros modelos virogenéticos, la reducción en la expresión de MKK6 podía producir algún cambio en la acumulación de lípidos en el hígado. Los resultados obtenidos en ratones microinyectados con GFP y CRE, no mostraron diferencias significativas en la lipogénesis en el hígado, aunque sí una tendencia a aumentar (Fig. 15).



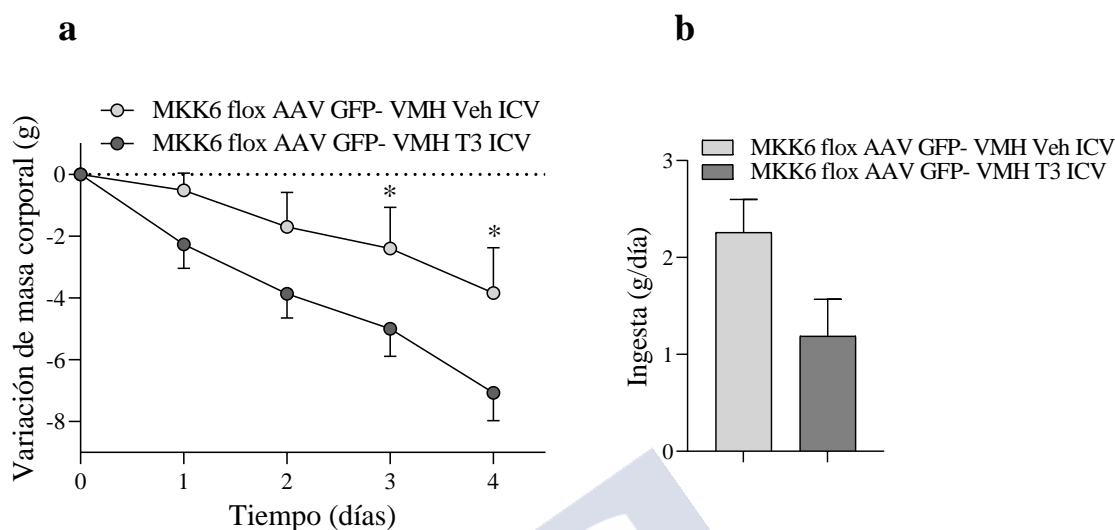
**Figura 15.** Efecto de la inhibición en el VMH de MKK6 sobre el metabolismo del hígado. (a) análisis de la tinción Oil Red O 40X; barra de escala; 50  $\mu$ m, imágenes representativas de secciones del hígado de ratones tratados con virus que expresan GFP y CRE recombinasa en dieta HFD (GFP n=12, CRE n=12), (b) análisis del área teñida con Oil Red O en % (GFP n=12, CRE n=12), (c) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (GFP n=12, CRE n=12). Los datos están expresados como media  $\pm$  SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas). P=0.07, P= 0,06 vs. GFP.

## 5.4 LA INHIBICIÓN DE MKK6 EN EL VMH REGULA LOS EFECTOS CENTRALES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

### 5.4.1 MKK6 en el VMH regula la acción de las THs sobre el peso corporal en HFD

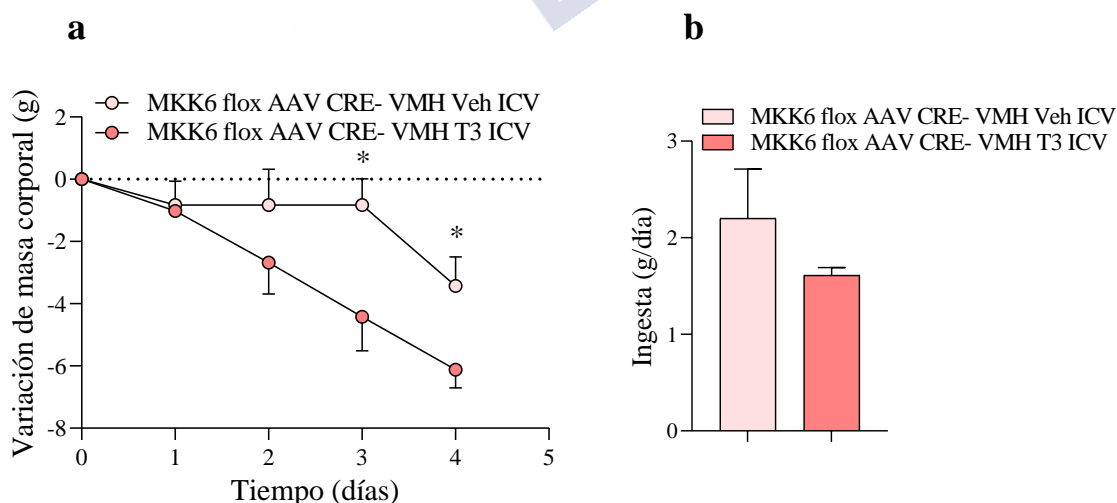
Para investigar si la inhibición en el VMH de MKK6 afectaba a la acción de las hormonas tiroideas, tal y como se describe en estudios recientes (Matesanz et al., 2017), tratamos ratones MKK6 flox con adenovirus asociados que expresaban la recombinasa CRE y GFP. Estos animales fueron alimentados con STD y HFD *ad libitum*. Al pasar 4 semanas, se les administró T3 ICV durante 5 días. Es necesario remarcar que la inyección de T3 ICV, provoca un marcado descenso del peso corporal, pero no así de la ingesta (Lopez et al., 2010). Los resultados obtenidos, mostraron que, en los animales control, la administración central de

T3 mantenía los efectos esperados sobre el peso corporal y la ingesta en los animales con STD, tanto en los inyectados con GFP (Fig 16 a y b) como en los CRE (Fig 17 a y b).



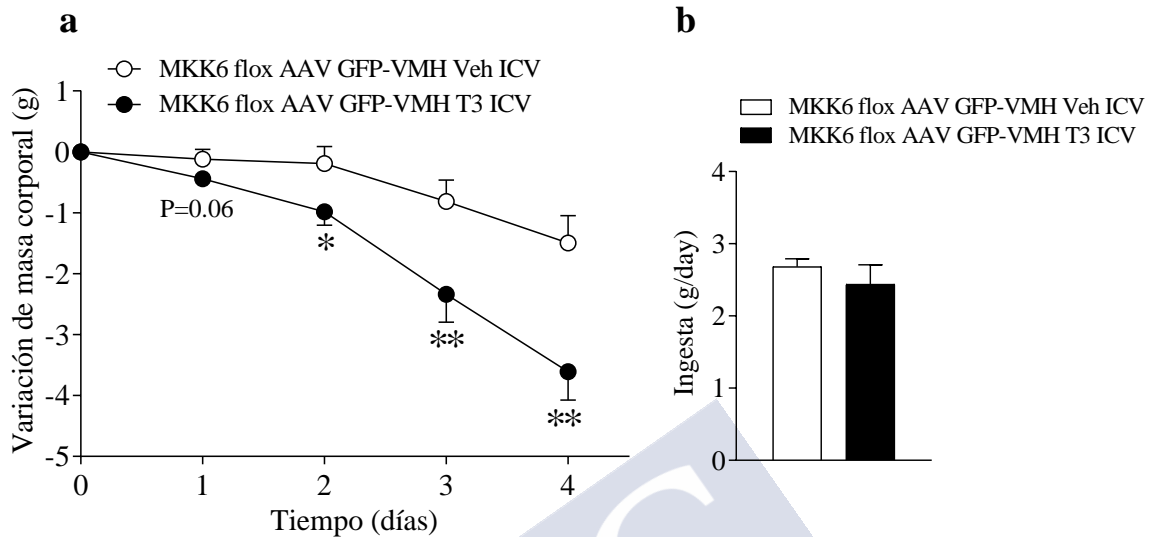
**Figura 16.** Efecto de T3 ICV sobre la masa corporal e ingesta en ratones MKK6 flox tratados con STD y AAV GFP en el VMH. (a) Variación de masa corporal (g) (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=6), (b) Ingesta (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=6). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas), \*P<0,05, \*\*P<0.01 vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

El hecho de que en STD los animales inyectados con AAV que expresaban CRE mostrasen una variación de masa corporal menor que sus controles, nos indicó que en condiciones de dieta estándar se mantenían los efectos centrales descritos en las hormonas tiroideas, por lo que en STD la falta de MKK6 no fue esencial para el efecto central de las hormonas tiroideas.



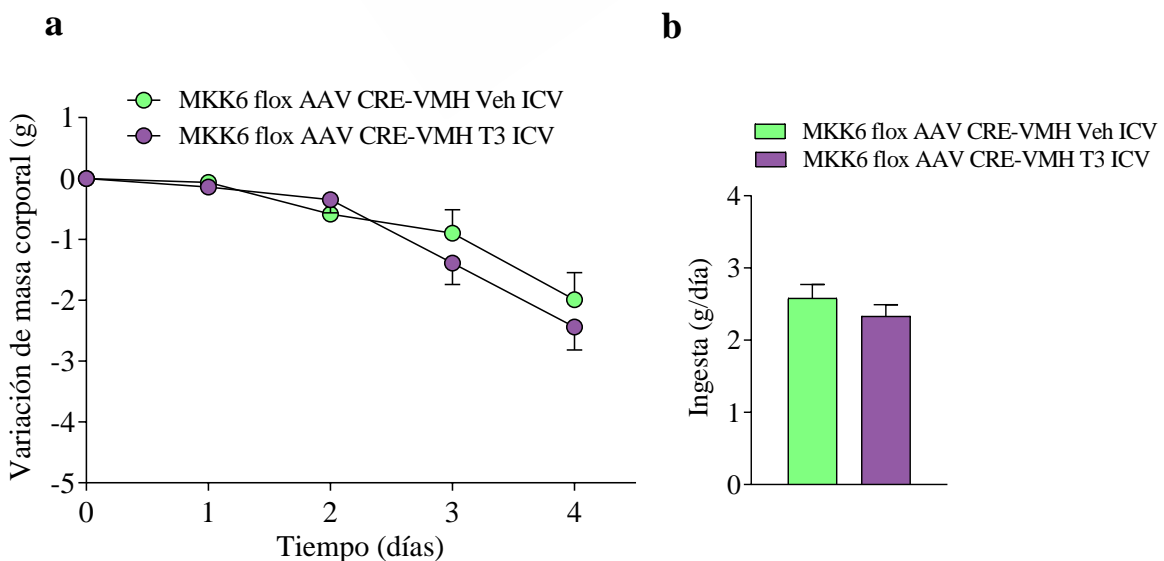
**Figura 17.** Efecto de T3 ICV sobre la masa corporal e ingesta en ratones MKK6 flox tratados con AAV STD y AAV CRE en el VMH. (a) Variación de masa corporal (g) (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=6), (b) Ingesta (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=6). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

El siguiente paso fue comprobar si en HFD ocurría lo mismo. Lo que nos encontramos fue una disminución de la masa corporal en los animales inyectados con GFP y T3 ICV, lo cual también nos señaló que en estas condiciones las hormonas tiroideas centralmente mantenían sus efectos (Fig 18 a y b).



**Figura 18.** Efecto de T3 ICV sobre la masa corporal e ingesta en ratones MKK6 flox tratados con HFD y AAV GFP en el VMH. (a) Variación de masa corporal (g) (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=10.), (b) Ingesta (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=10). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas), \*P<0,05, \*\*P<0.01 vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

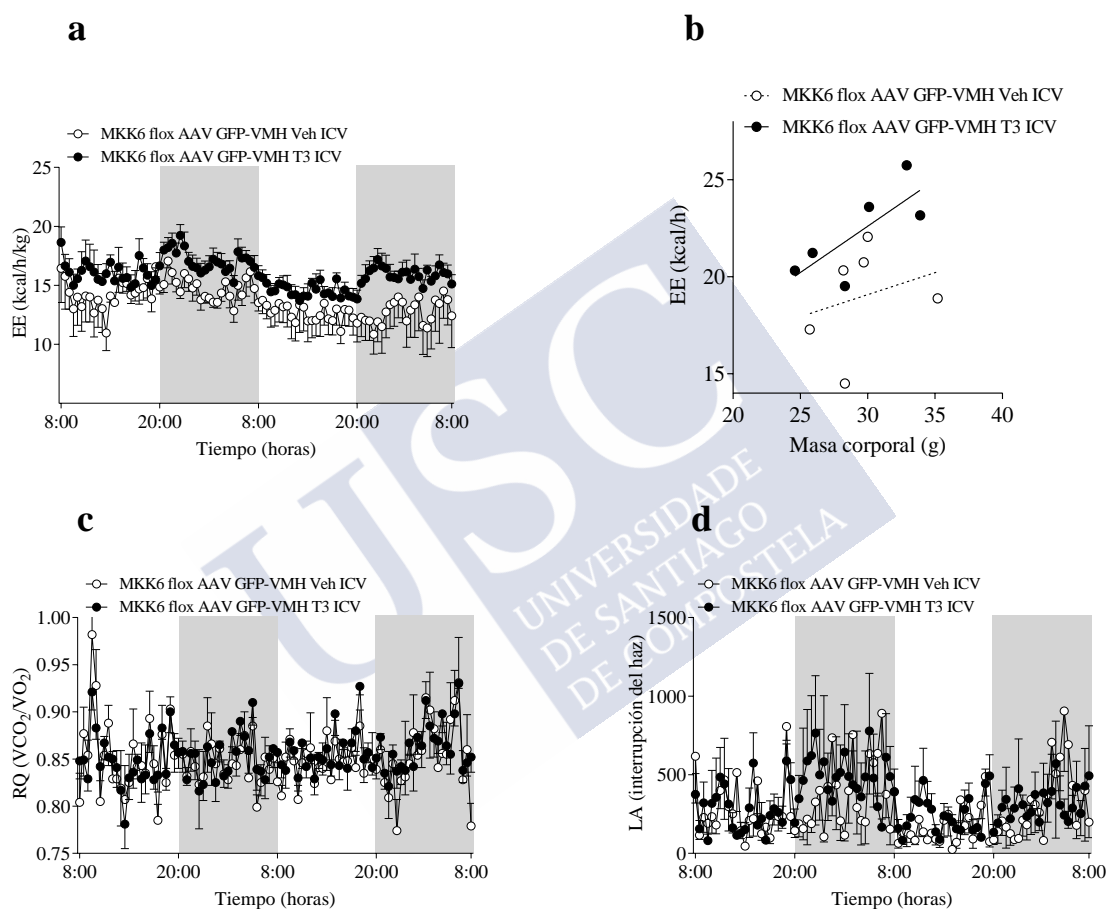
Los datos obtenidos en los animales tratados con AAVs codificantes de CRE, por el contrario, no mostraron variaciones significativas ni en el peso corporal ni en la ingesta (Fig. 19 a y b). En conjunto, estos datos nos indicaron que, en condiciones de obesidad inducida por dieta, MKK6 tenía un papel importante en la señalización de las hormonas tiroideas en el VMH.



**Figura 19.** Efecto de T3 ICV sobre la masa corporal e ingesta en ratones MKK6 flox tratados con AAV HFD y AAV CRE en el VMH. (a) Variación de masa corporal (g) (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=10), (b) Ingesta (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=10). Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

### 5.4.2 *MKK6* está implicada en la regulación del gasto energético por THs

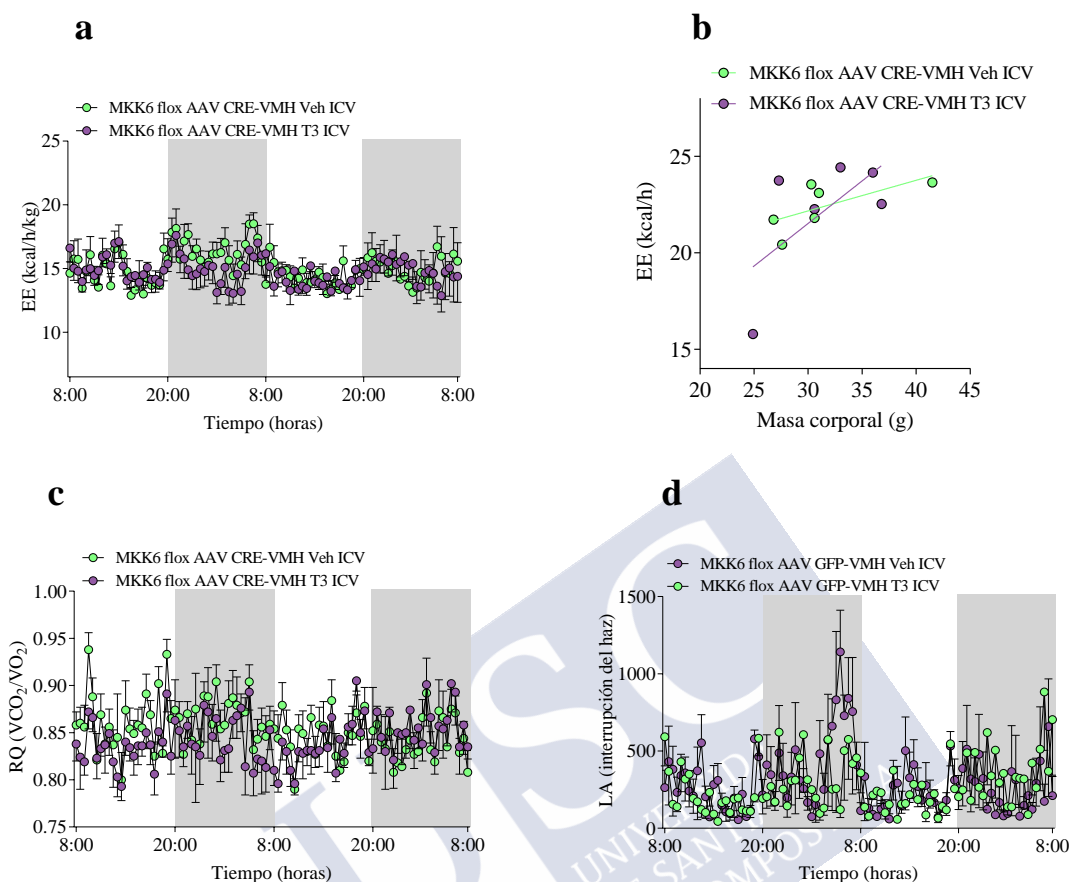
A continuación se procedió a realizar el fenotipado metabólico de estos animales, mediante calorimetría indirecta. Los resultados observados fueron un aumento en el gasto energético en los animales control tratados con T3 ICV (Fig. 20 a y b). En lo referente al cociente respiratorio y la actividad locomotora no se vieron cambios significativos (Fig. 20 c y d).



**Figura 20. Efecto de T3 ICV sobre el gasto energético en ratones *MKK6* flox tratados con AAV GFP y AAV CRE.** (a) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (GFP: *MKK6* flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=10, *MKK6* flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=10), (b) Gasto energético en relación a la masa corporal (GFP: *MKK6* flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=6, *MKK6* flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=6) (c) cociente respiratorio, RQ (*respiratory quotient*) (GFP: *MKK6* flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=6, *MKK6* flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=6) (d) actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (GFP: *MKK6* flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=6, *MKK6* flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=6.) de ratones tratadas con GFP en dieta HFD. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. *MKK6* flox AAV GFP-VMH.

En los animales tratados con AVVs codificantes de CRE las diferencias en el gasto energético (Fig 21 a y b) observadas anteriormente desaparecieron, y tampoco se vieron afectados ni el cociente respiratorio ni la actividad locomotora (Fig 21 c y d). Las observaciones obtenidas, mostraron que la inhibición de *MKK6* en el VMH, afectó al gasto energético que inducían las hormonas tiroideas de forma central.



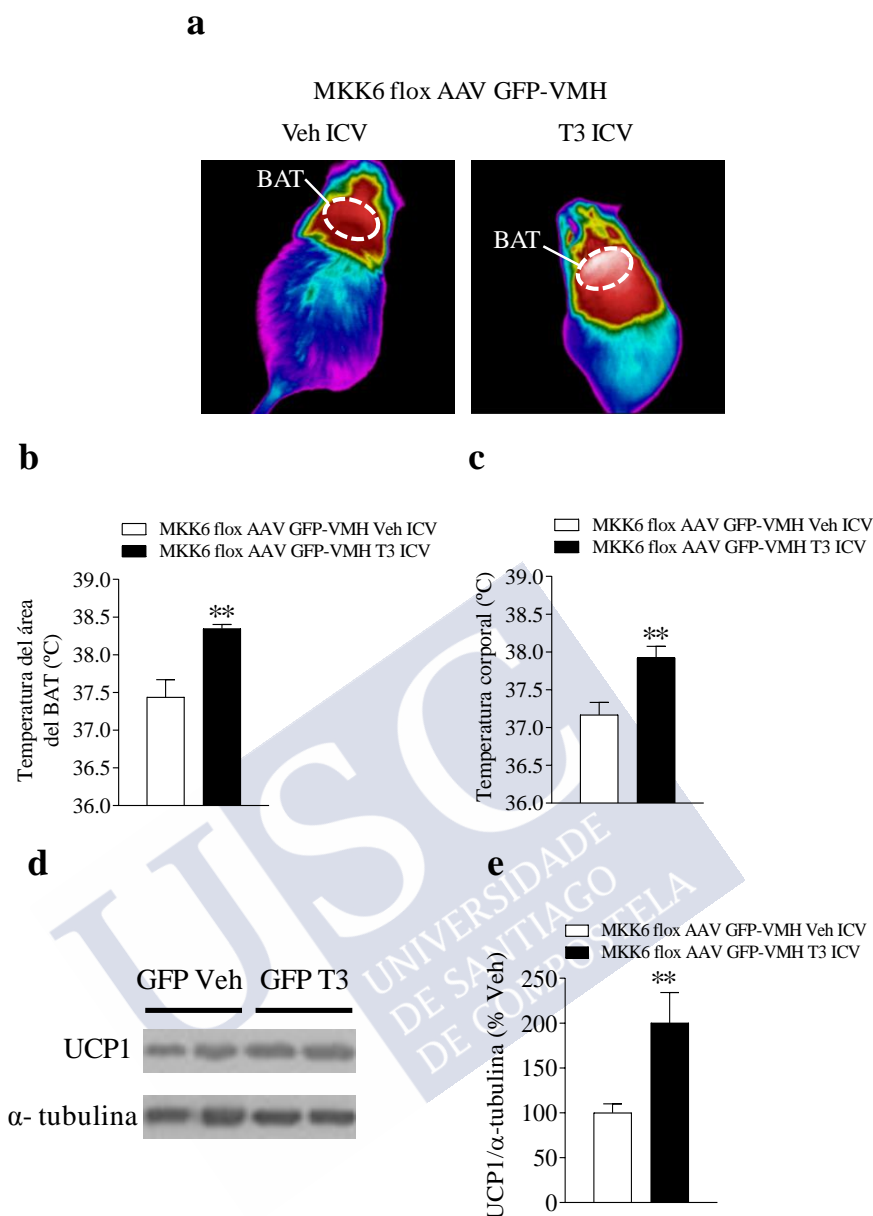


**Figura 21.** Efecto de T3 ICV sobre el gasto energético en ratones MKK6 flox tratados con AAV GFP y AAV CRE. (a) Gasto energético, EE (*energy expenditure*) (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=10), (b) Gasto energético en relación a la masa corporal (CRE: (MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=6) (c) cociente respiratorio, RQ (*respiratory quotient*) (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=6) (d) actividad locomotora, LA (*locomotor activity*) (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=6, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=6) de ratones tratadas con CRE en dieta HFD. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

### 5.4.3 MKK6 afecta a la capacidad termogénica del BAT

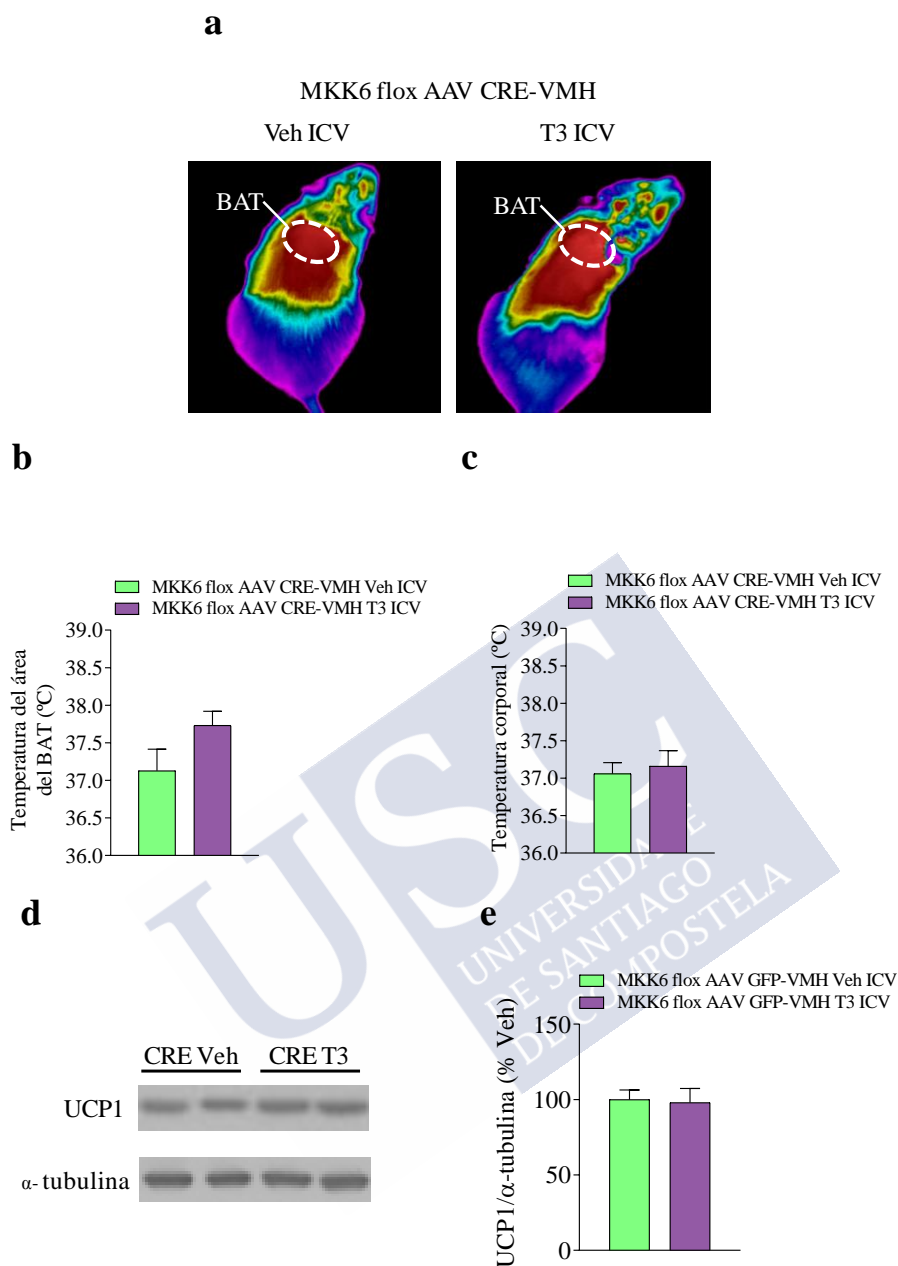
En vista de los resultados anteriores, decidimos estudiar la capacidad termogénica de estos animales. En la literatura, está ampliamente descrita la implicación central de las hormonas tiroideas sobre el BAT y el *browning*, habiendo un aumento de ambos tras la administración central de T3 (Lopez et al., 2013; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b). En nuestro modelo, los animales control tratados con T3 mostraron un aumento de la temperatura en el área del BAT (Fig. 22 a y b), así como un marcado incremento de la temperatura corporal (Fig 22 c). Se analizaron también los niveles de UCP1 en el BAT, viendo que se encontraban significativamente elevados (Fig 22 d y e).





**Figura 22. Efecto de T3 ICV sobre la termogénesis del BAT en ratones MKK6 flox tratados con AAV GFP y AAV CRE.** (a,b) Temperatura del área del BAT en ratones MKK6 flox tratados en el VMH con AAV GFP y Veh/ T3 ICV (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=10), (c) Temperatura corporal (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=10). Los datos están expresados como media±SEM. (d, e) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=7). Test t-student (2 colas). La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) \*\*P<0.01 vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

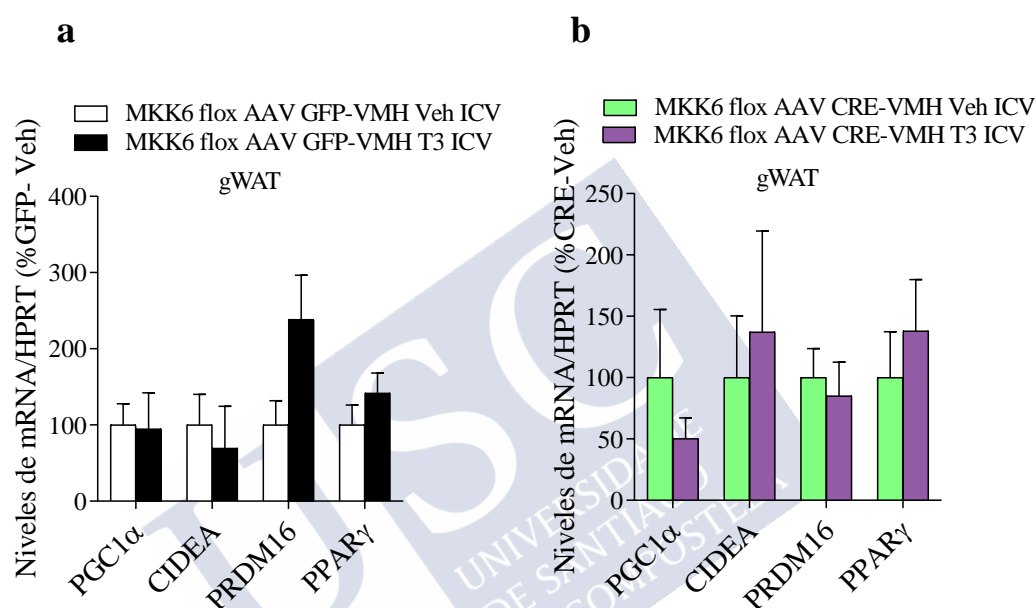
Los análisis de la función termogénica del BAT en los animales tratados con AAVs codificantes de CRE, por el contrario no mostraron cambios ni en la temperatura del BAT (Fig 23 a y b). Tampoco en la temperatura corporal (Fig 23 c). La expresión de UCP1 no se vió afectada por la inyección ICV de T3 en los animales tratados con AAVs codificantes de CRE (Fig 23 d y e). En conjunto, estos datos nos mostraron que la inhibición de MKK6 en el VMH también afectó a la capacidad termogénica del BAT, interfiriendo su falta en la señalización inducida por las hormonas tiroideas.



**Figura 23. Efecto de T3 ICV sobre la termogénesis del BAT en ratones MKK6 flox tratados con AAV GFP y AAV CRE.** (a,b) Temperatura del área del BAT en ratones MKK6 flox tratados en el VMH con AAV CRE y Veh/ T3 ICV (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=10), (c) Temperatura corporal (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=10, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=10). Los datos están expresados como media $\pm$ SEM. (d,e) niveles proteicos de UCP1 en el BAT (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=7). Test t-student (2 cola). La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas) vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH.

#### 5.4.4 MKK6 no tiene efectos sobre el browning de mediado por hormonas tiroideas

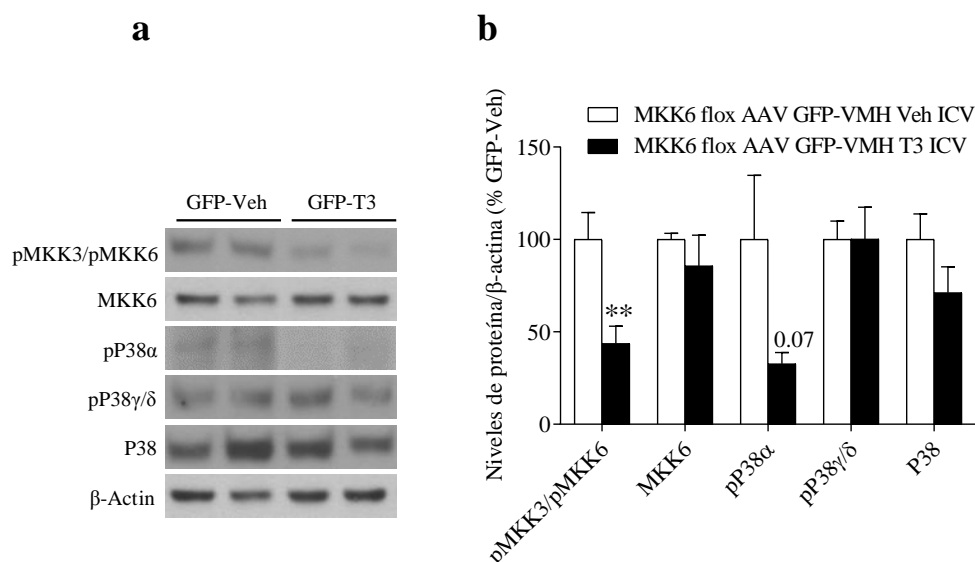
Debido a estos resultados, el siguiente paso fue estudiar el efecto de la eliminación de MKK6 en el VMH sobre el *browning* del tejido adiposo blanco. Los ratones tratados con GFP y T3 ICV, no mostraron un aumento de los marcadores termogénicos en grasa blanca gonadal (Fig 24), ni en el caso de animales tratados con AAV de GFP ni de CRE. Aunque evidencias de nuestro grupo sí han mostrado aumento del *browning* debido a la acción central de las hormonas tiroideas (Martinez-Sanchez et al., 2017a), este efecto en este caso podría estar enmascarado por el efecto de la HFD.



**Figura 24. Efecto de la eliminación de MKK6 en el VMH de ratones tratados con T3 ICV.** (a) Niveles de mRNA de marcadores termogénicos en la gWAT (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=8, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=8) y (b) Niveles de mRNA de marcadores termogénicos en gWAT (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=8, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=8). Test t-student (2 colas), \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. MKK6 flox AAV GFP-VMH. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM.

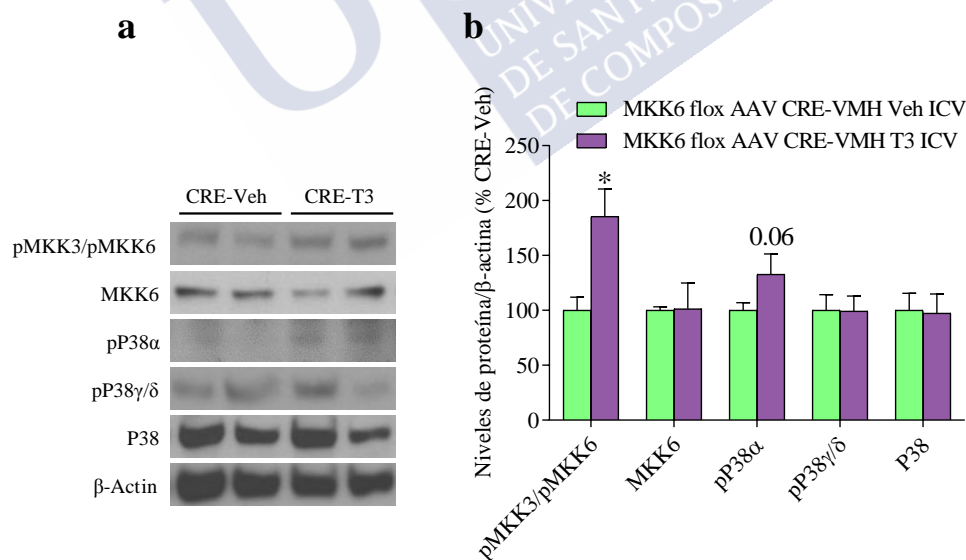
## 5.5 LA INHIBICIÓN DE MKK6 EN EL VMH REGULA LOS EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE LAS RUTAS DE AMPK Y ESTRÉS DEL RE

En primer lugar, se comprobó el estado de la ruta de las MAP quinasas en el VMH. Para ello se realizaron análisis moleculares de los niveles proteicos. En los animales control, se vieron diferencias en la expresión de pMKK3/ pMKK6 y pp38 $\alpha$ , ambas disminuídas en el grupo GFP T3 ICV (Fig 25 a y b), no se observaron cambios en los niveles del resto de las proteínas de la ruta.



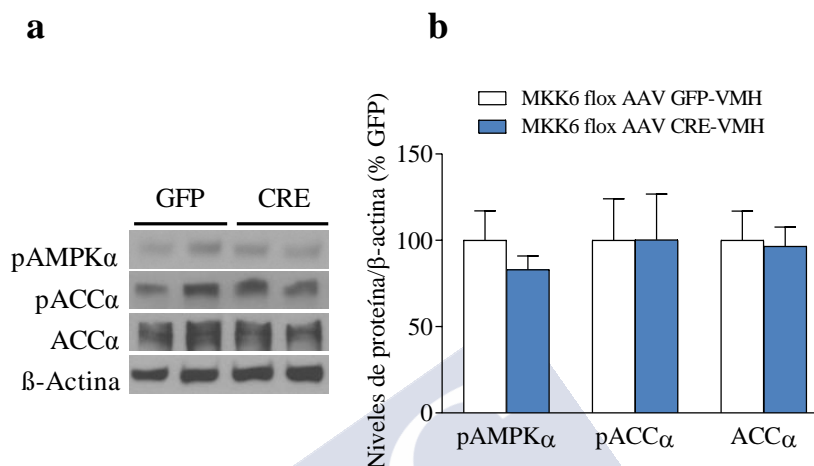
**Figura 25. Efecto de T3 ICV sobre la ruta de las MAPK en ratones MKK6 flox tratados con y AAV CRE y T3 ICV.** (a, b) niveles proteicos de las MAPK en el VMH de ratones tratados virus que expresan GFP (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD y (c, d) niveles proteicos de la ruta las MAPK en el VMH de ratones tratados virus que expresan CRE (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas). \*P<0.05 vs GFP, \*\*P<0.01 vs. GFP, \*\*\*P<0.001 vs. GFP. Las bandas de los gels han sido cortadas del mismo gel original.

Tras la microinyección de AVVs codificantes de CRE en el VMH, se observó que pMKK3/pMKK6 y pp38α aumentaban su expresión, sin alterar de nuevo ninguna de las otras proteínas de la ruta (Fig 26 a y b). Estos resultados nos indican que las hormonas tiroideas en el VMH están afectando a la fosforilación de MKK3, MKK6 y p38α. Estos cambios se revierten al inhibir MKK6.



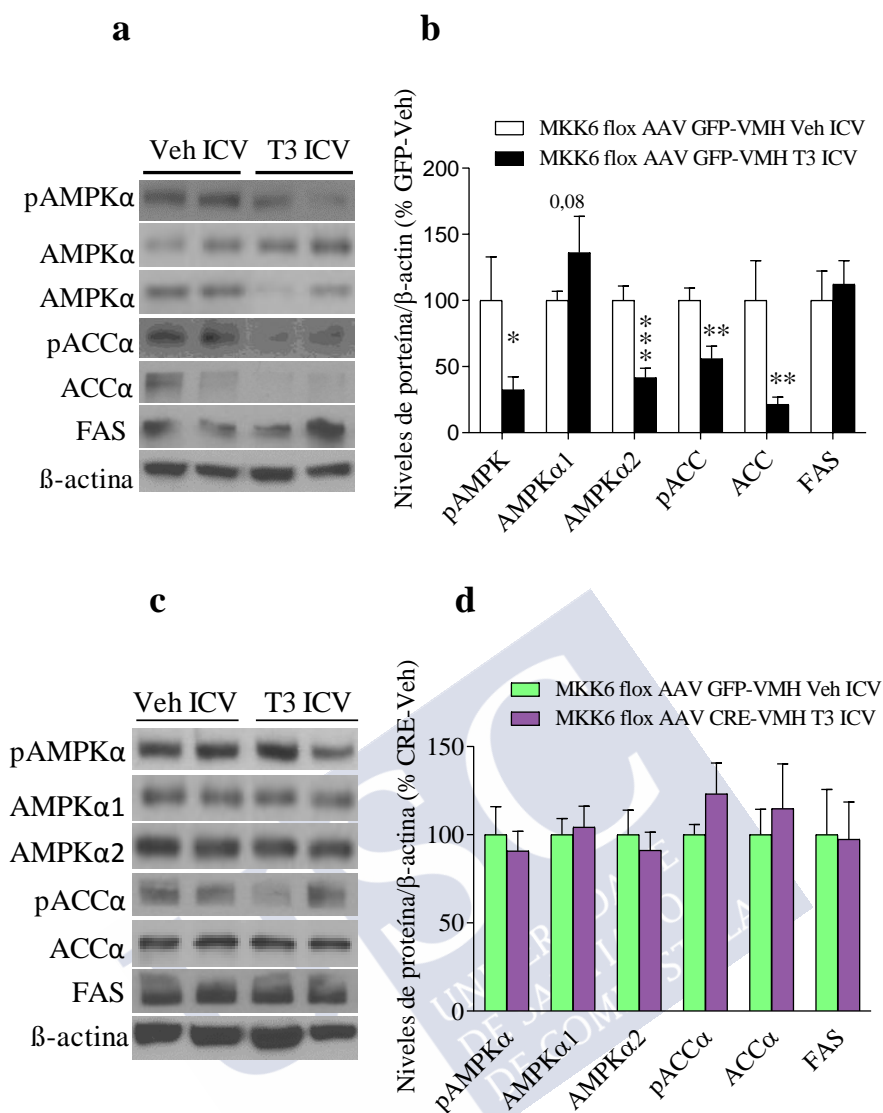
**Figura 26. Efecto de T3 ICV sobre la ruta de las MAPK en ratones MKK6 flox tratados con y AAV CRE y T3 ICV.** (a, b) niveles proteicos de las MAPK en el VMH de ratones tratados virus que expresan GFP (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD y (c, d) niveles proteicos de la ruta las MAPK en el VMH de ratones tratados virus que expresan CRE (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas). \*P<0.05 vs GFP, \*\*P<0.01 vs. GFP, \*\*\*P<0.001 vs. GFP. Las bandas de los gels han sido cortadas del mismo gel original.

Para caracterizar el efecto en el VMH que la eliminación de MKK6 podía estar ejerciendo sobre rutas clave de la modulación del balance energético, como son el estrés del RE o la ruta de AMPK, se realizaron análisis moleculares más exhaustivos. En el VMH de ratones tratados con AAVs codificantes de CRE, no se observaron cambios en las principales proteínas de la ruta de AMPK (Fig. 27).



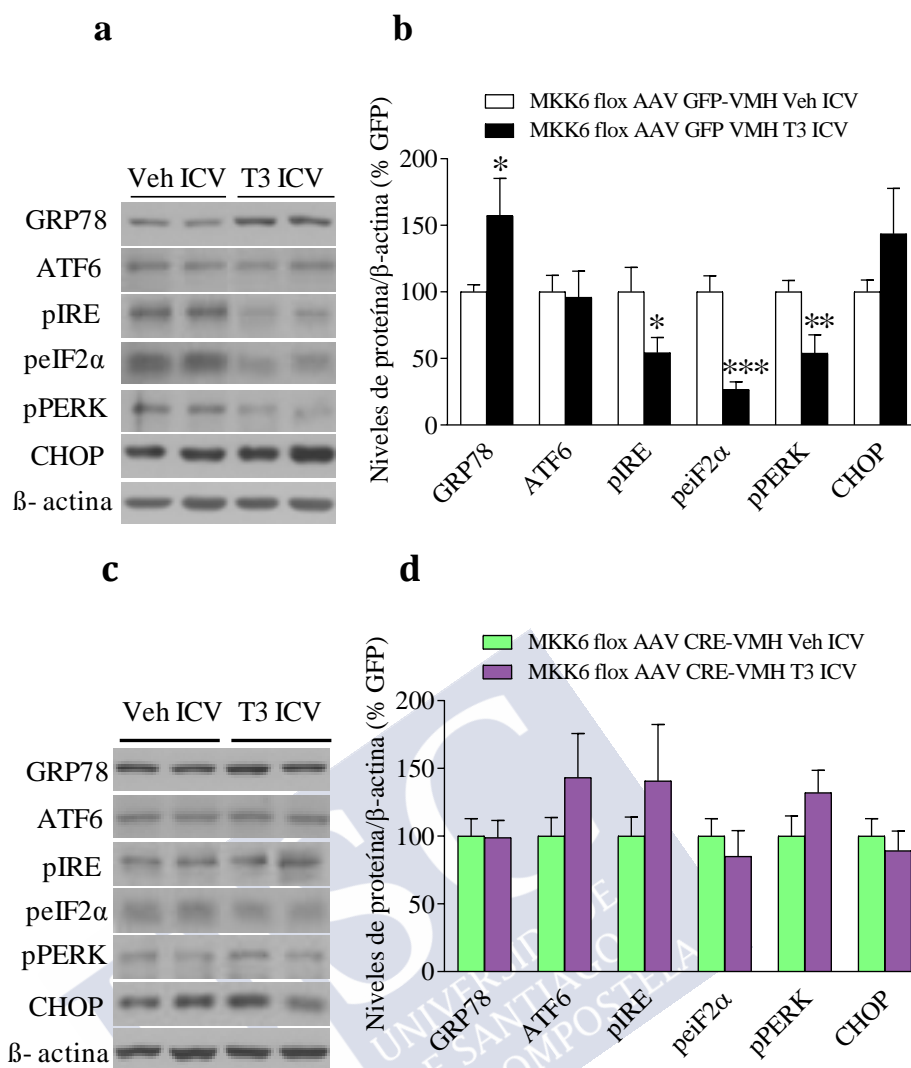
**Figura 27. Efecto de la microinyección de AAV CRE en el VMH sobre la ruta de AMPK.** (a) niveles proteicos de pAMPK $\alpha$ , pACC $\alpha$ , ACC $\alpha$  y  $\beta$ - actin en el VMH de ratones tratados con virus de CRE recombinasa (GFP n=7, CRE n=7). Test t-student (2 cola). Los datos están expresados como media $\pm$ SEM. Las bandas de los geles han sido cortadas del mismo gel original.

Sin embargo, al inyectar T3 central en ratones tratados con GFP, se observó una disminución en el VMH de los niveles proteicos de pAMPK, AMPK $\alpha$ 2, pACC, ACC (Fig 28 a y b). Por el contrario, AMPK $\alpha$ 1 y FAS, no mostraron cambios en el VMH de estos ratones. En los animales tratados con AAVs codificantes de CRE, por el contrario, no se vieron variaciones al inyectar T3 ICV (Fig 28 c y d), en concordancia con los datos sobre termogénesis, ya que una disminución en AMPK activa el BAT a través del SNS. La inhibición en la expresión de MKK6 en el VMH parecía estar afectando a la ruta de AMPK, normalmente disminuída por la acción de las hormonas tiroideas.



**Figura 28. Efecto de T3 ICV sobre la ruta de AMPK en ratones MKK6 flox tratados con y AAV CRE y T3 ICV.** (a, b) niveles proteicos de la ruta de AMPK en el VMH de ratones tratados virus que expresan GFP (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD y (c, d) niveles proteicos de la ruta de AMPK en el VMH de ratones tratados virus que expresan CRE (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas). \*P<0.05 vs GFP, \*\*P<0.01 vs. GFP, \*\*\*P<0.001 vs. GFP. Las bandas de los gels han sido cortadas del mismo gel original.

En relación con los datos anteriores, se analizaron los niveles de las principales proteínas implicadas en el estrés del RE. Los resultados en los animales tratados con GFP y T3 ICV mostraron una disminución significativa de la ruta, encontrando niveles más bajos de pIRE, peIf2α, pPERK y un aumento de la chaperona GRP78, ningún cambio se mostró en ATF6 ni CHOP (Fig 29 y b). Sin embargo, en los animales tratados con AAVs codificantes de CRE, no se vieron variaciones significativas en la ruta del estrés del RE (Fig 29 c y d). Estos datos en conjunto, nos muestran que la inhibición de MKK6 en el VMH estaría afectando también a la señalización por hormonas tiroideas sobre la ruta del estrés del RE.

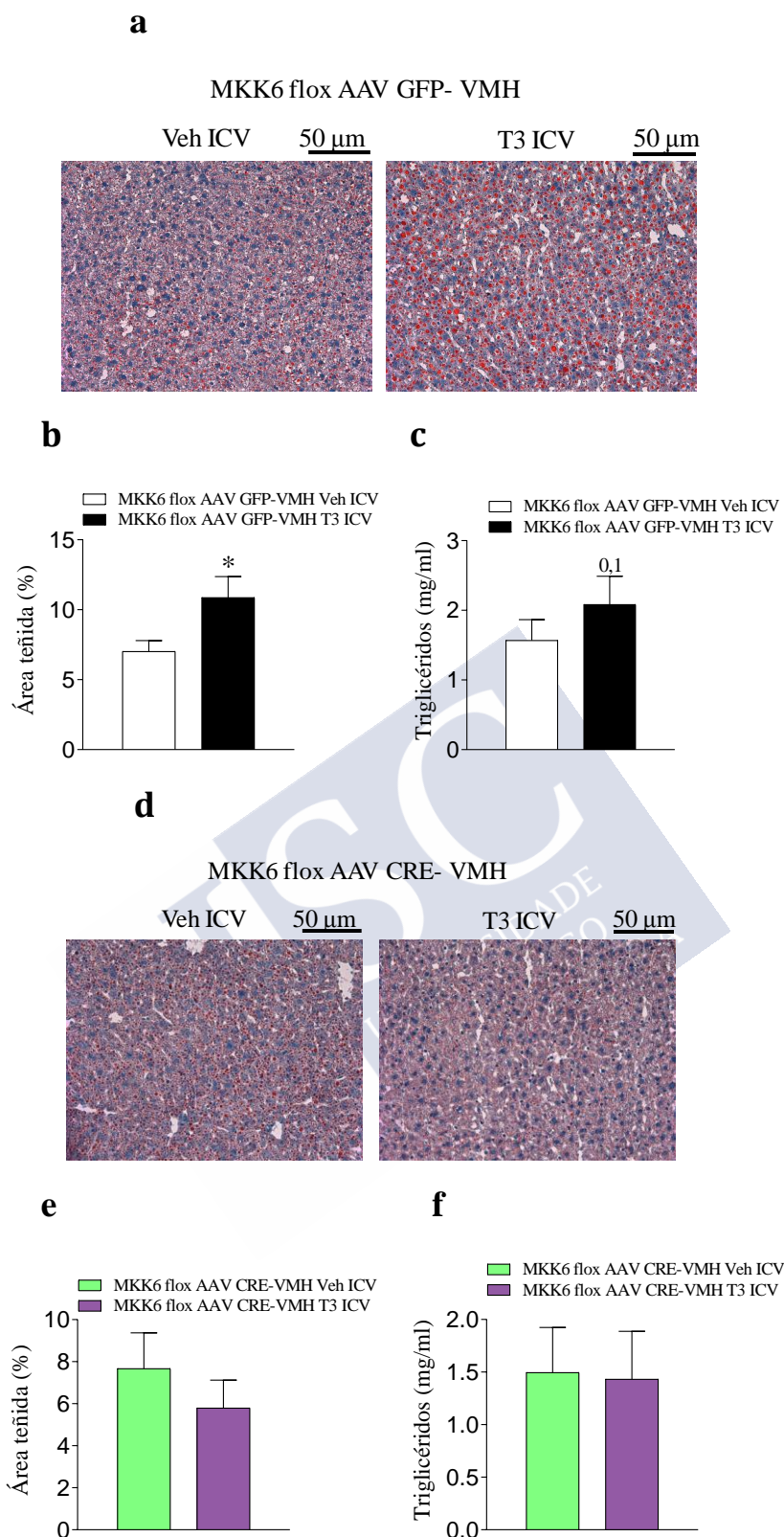


**Figura 29.** Efecto de T3 ICV sobre el estrés del RE en ratones MKK6 flox tratados con y AAV CRE y T3 ICV. (a, b) niveles proteicos de la ruta del estrés del RE en el VMH de ratones tratados virus que expresan GFP (GFP: MKK6 flox AAV GFP-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV GFP-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD y (c, d) niveles proteicos de la ruta del estrés del RE en el VMH de ratones tratados virus que expresan CRE (CRE: MKK6 flox AAV CRE-VMH Veh ICV n=7, MKK6 flox AAV CRE-VMH T3 ICV n=7) en dieta HFD. Los datos están expresados como media±SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas). \*P<0.05 vs GFP, \*\*P<0.01 vs. GFP, \*\*\*P<0.001 vs. GFP. Las bandas de los gels han sido cortadas del mismo gel original.

## 5.6 LA INHIBICIÓN DE MKK6 EN EL VMH REGULA LOS EFECTOS CENTRALES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS SOBRE EL CONTENIDO LIPÍDICO HEPÁTICO

Los análisis de triglicéridos en el hígado, mostraron un aumento en animales tratados con T3 ICV frente a sus controles (Fig 30 a-c). Sin embargo, tras la inhibición de MKK6, no se vieron diferencias entre los controles y el grupo con T3 ICV (Fig 30 d-f), indicando también un papel importante de MKK6 en la acción de las hormonas tiroideas de forma central sobre la lipogénesis del hígado.





**Figura 30. Efecto de la inhibición en el VMH de MKK6 en las acciones centrales de T3 sobre el metabolismo del hígado.** (a) imágenes representativas de Oil Red O de secciones del hígado de ratones inyectados con virus que expresan gfp, y tratados con veh ICV y T3 ICV en dieta HFD; 40X; barra de escala; 50  $\mu$ m (GFP Veh n=4, GFP T3 n=5), (b) análisis del área teñida con Oil Red O en % (GFP Veh n=4, GFP T3 n=5), (c) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (GFP Veh n=4, GFP T3 n=5). (d) imágenes representativas de Oil Red O de secciones del hígado de ratones inyectados con virus que expresan cre recombinasa, y tratados con veh ICV y T3 ICV en dieta HFD; 40X; barra de escala; 50  $\mu$ m, (CRE Veh n=5, CRE T3 n=5), (e) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (CRE Veh n=5, CRE T3 n=5) (f) análisis de la cantidad de triglicéridos en muestras de hígado en mg/ml (CRE Veh n=5, CRE T3 n=5). Los datos están expresados como media  $\pm$  SEM. La significación estadística fue determinada por t-Student (2 colas). \*P<0.05 vs. GFP Veh ICV.

En general, todos estos datos indican que para que la acción de las hormonas tiroideas sobre la termogénesis de BAT, el gasto energético y el contenido lipídico hepático se produzca, es necesaria la intervención de MKK6 en el VMH, aunque su eliminación por sí sola en estado basal y sin tratamiento alguno, no sea relevante.





# DISCUSIÓN





## 6 DISCUSIÓN

La obesidad es una de las dolencias prevenibles que más mortalidad causa en el mundo, debido a la aparición de enfermedades secundarias como pueden ser algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Clemmensen et al., 2017; Cui et al., 2017; Lopez and Tena-Sempere, 2017; Schneeberger et al., 2014; Tschop et al., 2016). La obesidad se desarrolla debido a una ingesta de calorías superior al gasto, generándose un balance energético positivo de manera crónica. Debido a ello, numerosas estrategias se han centrado en la disminución de la ingesta (Tschop et al., 2016). Sin embargo, las aproximaciones farmacéuticas que apuntaban en esta dirección, han fracasado, principalmente por las disminuciones compensatorias en el gasto energético (Lopez and Tena-Sempere, 2017). Entonces, es de vital importancia conocer todos los mecanismos que modulan la homeostasis energética, para identificar dianas terapéuticas efectivas en la obesidad.

Existen numerosos estudios que muestran la implicación del hipotálamo en los procesos termogénicos, tanto en el tejido adiposo blanco como en el tejido adiposo marrón. Numerosas evidencias indican que la regulación de la termogénesis se produce principalmente a nivel central y requiere la activación del SNS (Contreras et al., 2017a; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b). Existen diversas señales periféricas que pueden provocar esta activación del SNS y la consecuente modulación de la termogénesis y el *browning*. Esas señales pueden ser BMP8b (Martins et al., 2016; Whittle et al., 2012), la estimulación nicotínica (Seoane-Collazo et al., 2019; Seoane-Collazo et al., 2014), las ceramidas (Contreras et al., 2014), las hormonas tiroideas (Martinez-Sanchez et al., 2017a; Martinez-Sanchez et al., 2017b), el estradiol (Gonzalez-Garcia et al., 2018) o péptidos análogos de GLP-1 (Beiroa et al., 2014), todas integradas en el VMH. Se ha descrito que las hormonas tiroideas aumentan el metabolismo basal (Martinez-Sanchez et al., 2017b). Este hecho se ve apoyado por las observaciones realizadas en pacientes con disfunción tiroidea. El hipertiroidismo es un síndrome que provoca un aumento en la secreción de las hormonas tiroideas circulantes por la glándula tiroidea. Los pacientes con tirotoxicosis generalmente muestran pérdida de peso, aunque la mayoría de ellos sufren un aumento en la ingesta (Lopez et al., 2013; Silva, 2006). Sin embargo, el hipotiroidismo está asociado con un descenso del gasto energético y un aumento de peso corporal, aunque los pacientes exhiban una ingesta reducida (Lopez et al., 2013; Silva, 2006). Existe una incidencia del 20% de hipotiroidismo en los pacientes con obesidad, sugiriendo un papel importante de las hormonas tiroideas (Baxter and Webb, 2009; Brenta et al., 2007; Kaptein et al., 2009; Pearce, 2012a, b; Weaver, 2008). La visión clásica atribuye un papel directo de las hormonas tiroideas sobre el BAT, sin embargo estudios recientes, muchos de ellos de nuestro grupo, han demostrado que la relación entre las hormonas tiroideas, el SNS y el BAT tiene lugar a varios niveles, y que la acción de estas hormonas puede producirse en el hipotálamo, que señalaría al BAT, en lugar de actuar directamente sobre los adipocitos marrones (Cao et al., 2004; Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b).

En lo referente al *browning* y la termogénesis, la ruta de las quinasas de estrés de p38, se encuentra implicada en su modulación (Cao et al., 2004; Matesanz et al., 2017; Zhang et al., 2018). De hecho, recientes estudios han sugerido una conexión entre la acción de las hormonas tiroideas y la ablación de MKK6 que fosforila a p38, provocando la pérdida de capacidad termogénica en la grasa blanca (Matesanz et al., 2017). Debido a la ya demostrada acción central de las hormonas tiroideas (Lopez et al., 2010; Martinez-Sanchez et al., 2017b),

en este estudio se ha intentado determinar si a nivel central se reproducen los mismos efectos que las hormonas tiroideas ejercen en la periferia (Matesanz et al., 2017). Las herramientas utilizadas implican la ablación de MKK6 mediante la metodología cre-lox utilizando aproximaciones experimentales de virogenética.

En una primera aproximación se han inyectado adenovirus asociados en el VMH que expresarían la recombinasa CRE. Esta recombinasa, en ratones portadores de secuencias LoxP flanqueando el gen que expresa MKK6, da lugar a una ablación genética de esta MAP2K. Después de 6 semanas de alimentación con dieta alta en grasa no se han visto diferencias ni en el peso ni en la ingesta de los animales, así como tampoco en el cociente respiratorio, actividad locomotora o gasto energético. Por lo que respecta a la activación del BAT, no se han visto cambios, ni con alimentación estándar ni alta en grasas. Estos datos concuerdan con los hallazgos en estudios recientes, en los que se produce la ablación no selectiva de MKK6 en el VMH, mediante lentivirus que expresan shRNAs, en ratones también alimentados con HFD. En este caso, tampoco se han visto cambios significativos (Matesanz et al., 2017). En lo que se refiere al metabolismo de la glucosa, no se han encontrado variaciones en los ensayos de glucosa e insulina realizados, ni en animales con dieta STD ni HFD. Estos datos concuerdan con estos estudios anteriores, en los que tampoco se ve una protección frente al desbalance en el metabolismo de la glucosa inducido por la dieta alta en grasas (Matesanz et al., 2017). Sin embargo, sí se han visto diferencias en los niveles basales de glucosa en los animales con dieta STD, aumentando en aquellos tratados con virus CRE, tanto en ayuno como *ad libitum*. En numerosos estudios se postula la implicación de p38 en el metabolismo de la glucosa. Los resultados obtenidos, mostraron que la ablación genética de la isoforma p38 $\alpha$  o de MAP quinasas que fosforilan a p38, mejora la sensibilidad a insulina y glucosa en animales sometidos a HFD (Matesanz et al., 2017; Zhang et al., 2017). Por otro lado, algunos estudios *in vitro* han intentado descifrar la implicación de MKK6 sobre los transportadores de glucosa en adipocitos y células musculares. Los datos mostraron que aunque su acción no es esencial para la absorción de glucosa, sí tiene cierta implicación en la activación de los receptores GLUT1 y GLUT4. Por ello, la incorporación de glucosa podría verse alterada, disminuyendo el transporte dependiente de insulina a las células que sobreexpresan MKK6 (Bengal et al., 2020; Fujishiro et al., 2001; Somwar et al., 2002). Desde el punto de vista de la función pancreática, también se ha estudiado la implicación de p38 $\delta$ , viéndose que la producción de insulina y la homeostasis de la glucosa, se encuentran reguladas negativamente (Sumara et al., 2009). Habría que determinar si un efecto central de MKK6 podría modular, en condiciones basales, el transporte de glucosa al músculo o células hepáticas.

El siguiente objetivo, ha sido ver los efectos de la ablación de MKK6 en el VMH bajo la inyección de T3 en HFD. En anteriores estudios se ha descrito que los efectos de MKK6 sobre el *browning* se producen principalmente bajo la estimulación por hormonas tiroideas (Matesanz et al., 2017). Los resultados mostraron que los animales control, mantenían la pérdida de peso y el aumento del gasto energético al inyectar T3 centralmente, todo ello sin afectar a la ingesta, resultados ya descritos en numerosos estudios (Martinez-Sanchez et al., 2017a; Martinez-Sanchez et al., 2017b). Sin embargo, estos efectos desaparecen en los animales en los que se produce la inhibición de MKK6, sugiriendo un papel de esta MAP2K en la acción central de las hormonas tiroideas. Hasta ahora se había descrito el rol periférico que ejercía la ruta de las quinasas p38 sobre el *browning* (Matesanz et al., 2017; Matesanz et al., 2018; Zhang et al., 2018), pero es de gran interés que en nuestros estudios además se establezca la importancia de estas quinasas a nivel central en la acción de las hormonas tiroideas.



Seguidamente, se ha intentado caracterizar la ruta de las MAP quinasas en el VMH. Se analizó la expresión de MKK6, además de las distintas isoformas de p38. Estos análisis mostraron que la reducción en la expresión de MKK6 se producía correctamente al inyectar virus que expresaban CRE. Además, se ha visto que se reduce de manera significativa la fosforilación de la isoforma p38 $\alpha$ , mientras que la de p38 $\gamma/\delta$  se ve aumentada. Se ha comprobado, que la inyección de hormonas tiroideas centralmente, produce una disminución en la fosforilación de MKK3, MKK6 y p38 $\alpha$ , mientras que al inhibir la expresión de MKK6, estos resultados se revierten. Estos datos nos muestran que estas MAP quinasas tienen un papel importante en la señalización por hormonas tiroideas, viéndose que la inhibición de MKK6 elimina por completo los efectos producidos por T3 central. Posteriormente, se analizaron las rutas de AMPK y estrés del RE, ya que se encuentran directamente moduladas por las hormonas tiroideas a nivel central (Martinez-Sanchez et al., 2017a; Martinez-Sanchez et al., 2017b). La inhibición de MKK6 en el VMH no produce ningún efecto sobre estas rutas. Sin embargo, al tratar animales con CRE y T3, se observó que ninguna de las dos rutas mantenía las variaciones mostradas en los animales control. Estudios recientes han determinado una ruta alternativa en la fosforilación de p38, implicando a la proteína activada por el factor de crecimiento transformante beta (TAB-1, TGF- beta activated kinase 1), la quinasa TAK1 y AMPK, todo ello sin la intervención de las MAP2K o las MAP3K (Ge et al., 2002; Lanna et al., 2014; Matesanz et al., 2017). En condiciones normales, la acción de las hormonas tiroideas provoca una inhibición de la ruta AMPK, tal y como se reporta en la bibliografía (Lopez et al., 2010), por lo que al existir la expresión de MKK6, p38 es fosforilada normalmente a través de la cascada de las MAP quinasas, provocando una consecuente activación del BAT. Sin embargo, en los ratones en los que se suprime la actividad de MKK6, no se observan cambios en la ruta de AMPK al inyectar T3, por lo que se podría sugerir que MKK6 mediaría también en la acción de las hormonas tiroideas sobre AMPK. Lo mismo ocurre con la ruta del estrés del RE, ya que se ve aumentada GRP78 y disminuidos significativamente varios de los miembros de la UPR (pIRE y pPERK), así como CHOP y p $\text{eIF}2\alpha$ , mientras que estos cambios no se observan al inyectar T3 en los grupos en los que se inhibe MKK6. Está demostrado que la ruta de las MAP quinasas se activa en respuesta al estrés del RE, en concreto se ha observado que la ruta de las quinasas p38 se encuentra relacionada con la activación de ATF6 $\alpha$  y CHOP (Darling and Cook, 2014; Kim et al., 2019; Thuerauf et al., 1998), por lo que cabría esperar que al eliminar una de las MAP2K que fosforilan y activan a p38, la acción de las hormonas tiroideas sobre el estrés del RE se vea afectada.

En lo que se refiere a la termogénesis, estudios recientes han sugerido una fuerte relación entre la ablación de MKK6 y el *browning*, viéndose bloqueada su inducción por hormonas tiroideas en presencia de MKK6 (Matesanz et al., 2017). En nuestros resultados, no se observaron cambios ni en los marcadores de *browning* ni en la expresión de UCP1 en el BAT al eliminar MKK6 en el VMH. Sin embargo, sí se mostró una activación del BAT y un aumento de UCP1 en los grupos control con T3 ICV, además de un aumento de PRDM16 y PPAR $\gamma$  en la grasa subcutánea (Martinez-Sanchez et al., 2017b; Martinez de Morentin et al., 2010). Estos resultados sugieren su implicación también en la activación del BAT por hormonas tiroideas, aunque estudios realizados en adipocitos marrones ya habían establecido esta relación en su día, quedando por desvelar si de forma central se reproducirían los efectos (Cao et al., 2004).

Finalmente, debido a evidencias anteriores de nuestro grupo (Martinez-Sanchez et al., 2017b) han relacionado otras MAP quinasas con la lipogénesis *de novo* en el hígado ante la

inyección central de T3, en concreto de la ruta de JNK, se ha intentado investigar si eso ocurriría en nuestras aproximaciones virogenéticas de MKK6. De nuevo, la ablación central de MKK6 por sí sola muestra apenas una tendencia al alza, lo que no parece indicar una gran importancia de MKK6 de forma central. Sin embargo, sí que se ha observado que la supresión de esta quinasa al inyectar T3 de forma central, impide la acción de las hormonas tiroideas desde el hipotálamo hasta el hígado, de la misma forma que si se suprime la acción central de JNK (Martinez-Sanchez et al., 2017b). Estudios previos han mostrado que la inhibición química de p38 aumenta la expresión de genes lipogénicos en animales en estado de ayuno (Xiong et al., 2007).

Los datos obtenidos muestran que la ablación de MKK6 por sí sola no influye en el metabolismo, aunque tras la administración central de T3, se suprimen los efectos tanto termogénicos en el BAT y lipogénicos en el hígado esperados, lo que sugiere un papel de MKK6 en el VMH para la acción de las hormonas tiroideas. El hecho de que no se muestren cambios en la ruta de AMPK en los grupos con reducción en la expresión de MKK6, indica que esta quinasa está interviniendo de alguna forma en la actividad de las hormonas tiroideas sobre AMPK, lo que impide la activación del SNS y reduce la capacidad termogénica del BAT y también la lipogénesis *de novo* en el hígado. Por otro lado, se sugiere que estos efectos se deben principalmente a la reducción en la activación de la isoforma p38 $\alpha$ , por lo que podría tener un papel central de gran importancia en el metabolismo energético. Quedaría por determinar cuál es la relación de esta MAP2K con AMPK. En estudios anteriores se ha propuesto y demostrado que la vía que parece intervenir en esta relación es la de TAK1 y TAB1, ya que estas son MAP3 quinases que promueven la activación tanto de MKK6 como de AMPK. Estos resultados contribuyen al estudio de la familia de las MAPK p38 en el campo del metabolismo, y establecen por primera vez su importancia a nivel central mediando el efecto de las hormonas tiroideas sobre el gasto energético, la termogénesis y la lipogénesis hepática.

# CONCLUSIONES





## 7 CONCLUSIONES

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

- La inhibición de MKK6 en el VMH por sí sola no es importante en la regulación del peso corporal, el gasto energético o la termogénesis.
- Los efectos producidos por las hormonas tiroideas centralmente son dependientes de la expresión de MKK6 en el VMH, así como la modulación de la termogénesis, el *browning* o la lipogénesis hepática.





# BIBLIOGRAFÍA







## 8 BIBLIOGRAFÍA

Abdalla, S.M., and Bianco, A.C. (2014). Defending plasma T3 is a biological priority. *Clin Endocrinol (Oxf)* *81*, 633-641.

Abizaid, A., Gao, Q., and Horvath, T.L. (2006). Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron* *51*, 691-702.

Achard, C.S., and Laybutt, D.R. (2012). Lipid-induced endoplasmic reticulum stress in liver cells results in two distinct outcomes: adaptation with enhanced insulin signaling or insulin resistance. *Endocrinology* *153*, 2164-2177.

Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., and White, M.F. (2002). Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* *277*, 1531-1537.

Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 327-332.

Al-Massadi, O., Muller, T., Tschop, M., Dieguez, C., and Nogueiras, R. (2018). Ghrelin and LEAP-2: Rivals in Energy Metabolism. *Trends Pharmacol Sci* *39*, 685-694.

Alkemade, A. (2010). Central and peripheral effects of thyroid hormone signalling in the control of energy metabolism. *J Neuroendocrinol* *22*, 56-63.

Alkemade, A., Vuijst, C.L., Unmehopa, U.A., Bakker, O., Vennstrom, B., Wiersinga, W.M., Swaab, D.F., and Fliers, E. (2005). Thyroid hormone receptor expression in the human hypothalamus and anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 904-912.

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

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

Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., and Small, C.J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* *279*, 12005-12008.

Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* *1072*, 129-157.

Antoniou, X., Falconi, M., Di Marino, D., and Borsello, T. (2011). JNK3 as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* *24*, 633-642.

Aouadi, M., Laurent, K., Prot, M., Le Marchand-Brustel, Y., Binetruy, B., and Bost, F. (2006). Inhibition of p38MAPK increases adipogenesis from embryonic to adult stages. *Diabetes* *55*, 281-289.

- Arase, K., York, D.A., Shimizu, H., Shargill, N., and Bray, G.A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255, E255-259.
- Babic, T., Purpera, M.N., Banfield, B.W., Berthoud, H.R., and Morrison, C.D. (2010). Innervation of skeletal muscle by leptin receptor-containing neurons. *Brain Res* 1345, 146-155.
- Babu, G.J., Lalli, M.J., Sussman, M.A., Sadoshima, J., and Periasamy, M. (2000). Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 32, 1447-1457.
- Bamshad, M., Aoki, V.T., Adkison, M.G., Warren, W.S., and Bartness, T.J. (1998). Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol* 275, R291-299.
- Bamshad, M., Song, C.K., and Bartness, T.J. (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276, R1569-1578.
- Banting, F.G., Best, C.H., Collip, J.B., Campbell, W.R., and Fletcher, A.A. (1922). Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Can Med Assoc J* 12, 141-146.
- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Ittrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., *et al.* (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med* 17, 200-205.
- Bartha, T., Kim, S.W., Salvatore, D., Gereben, B., Tu, H.M., Harney, J.W., Rudas, P., and Larsen, P.R. (2000). Characterization of the 5'-Flanking and 5'-Untranslated Regions of the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Responsive Human Type 2 Iodothyronine Deiodinase Gene1. *Endocrinology* 141, 229-237.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., *et al.* (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650-654.
- Baxter, J.D., and Webb, P. (2009). Thyroid hormone mimetics: potential applications in atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 8, 308-320.
- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Ferno, J., Salvador, J., Escalada, J., *et al.* (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 63, 3346-3358.
- Bengal, E., Aviram, S., and Hayek, T. (2020). p38 MAPK in Glucose Metabolism of Skeletal Muscle: Beneficial or Harmful? *Int J Mol Sci* 21.
- Benoit, S.C., Kemp, C.J., Elias, C.F., Abplanalp, W., Herman, J.P., Migrenne, S., Lefevre, A.L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Yu, F., *et al.* (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. *J Clin Invest* 119, 2577-2589.

- Berg, A.H., Combs, T.P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P.E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7, 947-953.
- Bernardis, L.L., and Bellinger, L.L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 189-287.
- Berry, R., Jeffery, E., and Rodeheffer, M.S. (2014). Weighing in on adipocyte precursors. *Cell Metab* 19, 8-20.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.
- Bi, S., Kim, Y.J., and Zheng, F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* 46, 309-314.
- Bi, S., Robinson, B.M., and Moran, T.H. (2003). Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R1030-1036.
- Bianco, A.C., Kieffer, J.D., and Silva, J.E. (1992). Adenosine 3',5'-monophosphate and thyroid hormone control of uncoupling protein messenger ribonucleic acid in freshly dispersed brown adipocytes. *Endocrinology* 130, 2625-2633.
- Bianco, A.C., and Kim, B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116, 2571-2579.
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., and Larsen, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23, 38-89.
- Bianco, A.C., Sheng, X.Y., and Silva, J.E. (1988). Triiodothyronine amplifies norepinephrine stimulation of uncoupling protein gene transcription by a mechanism not requiring protein synthesis. *J Biol Chem* 263, 18168-18175.
- Bianco, A.C., and Silva, J.E. (1987a). Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest* 79, 295-300.
- Bianco, A.C., and Silva, J.E. (1987b). Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* 120, 55-62.
- Bianco, A.C., and Silva, J.E. (1987c). Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T3 generation. *Am J Physiol* 253, E255-263.
- Boden, G. (2009). Endoplasmic reticulum stress: another link between obesity and insulin resistance/inflammation? *Diabetes* 58, 518-519.

- Bogoyevitch, M.A., and Kobe, B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1061-1095.
- Bommiasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J., *et al.* (2009). ATF6 $\alpha$  induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 122, 1626-1636.
- Borg, W.P., Sherwin, R.S., During, M.J., Borg, M.A., and Shulman, G.I. (1995). Local ventromedial hypothalamus glucopenia triggers counterregulatory hormone release. *Diabetes* 44, 180-184.
- Boulant, J.A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* 31 *Suppl* 5, S157-161.
- Brent, G.A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 122, 3035-3043.
- Brenta, G., Danzi, S., and Klein, I. (2007). Potential therapeutic applications of thyroid hormone analogs. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3, 632-640.
- Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G., and Hokfelt, T. (1998a). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J Comp Neurol* 402, 460-474.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hokfelt, T. (1998b). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15043-15048.
- Bukowiecki, L.J., Geloan, A., and Collet, A.J. (1986). Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am J Physiol* 250, C880-887.
- Bulavin, D.V., Saito, S., Hollander, M.C., Sakaguchi, K., Anderson, C.W., Appella, E., and Fornace, A.J., Jr. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* 18, 6845-6854.
- C, P.G.W. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.*, 7th Ed. edn (Academic Press).
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
- Camino, J.E., Nogueiras, R., Blanco, M., Seoane, L.M., Bravo, S., Alvarez, C.V., Garcia-Caballero, T., Casanueva, F.F., and Dieguez, C. (2003a). Cellular distribution and regulation of ghrelin messenger ribonucleic acid in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 144, 5089-5097.
- Camino, J.E., Tena-Sempere, M., Gaytan, F., Sanchez-Criado, J.E., Barreiro, M.L., Nogueiras, R., Casanueva, F.F., Aguilar, E., and Dieguez, C. (2003b). Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144, 1594-1602.

- Canettieri, G., Celi, F.S., Baccheschi, G., Salvatori, L., Andreoli, M., and Centanni, M. (2000). Isolation of human type 2 deiodinase gene promoter and characterization of a functional cyclic adenosine monophosphate response element. *Endocrinology* *141*, 1804-1813.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* *84*, 277-359.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2017). What Ignites UCP1? *Cell Metab* *26*, 697-698.
- Cano, G., Passerin, A.M., Schiltz, J.C., Card, J.P., Morrison, S.F., and Sved, A.F. (2003). Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *J Comp Neurol* *460*, 303-326.
- Cansell, C., and Luquet, S. (2016). Triglyceride sensing in the reward circuitry: A new insight in feeding behaviour regulation. *Biochimie* *120*, 75-80.
- Cao, S.S., and Kaufman, R.J. (2013). Targeting endoplasmic reticulum stress in metabolic disease. *Expert Opin Ther Targets* *17*, 437-448.
- Cao, W., Daniel, K.W., Robidoux, J., Puigserver, P., Medvedev, A.V., Bai, X., Floering, L.M., Spiegelman, B.M., and Collins, S. (2004). p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol* *24*, 3057-3067.
- Cao, W., Medvedev, A.V., Daniel, K.W., and Collins, S. (2001). beta-Adrenergic activation of p38 MAP kinase in adipocytes: cAMP induction of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene requires p38 MAP kinase. *J Biol Chem* *276*, 27077-27082.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* *75*, 50-83.
- Carriere, A., Ray, H., Blenis, J., and Roux, P.P. (2008). The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci* *13*, 4258-4275.
- Casanueva, F.F., and Dieguez, C. (1999). Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* *20*, 317-363.
- Castillo, M., Hall, J.A., Correa-Medina, M., Ueta, C., Kang, H.W., Cohen, D.E., and Bianco, A.C. (2011). Disruption of thyroid hormone activation in type 2 deiodinase knockout mice causes obesity with glucose intolerance and liver steatosis only at thermoneutrality. *Diabetes* *60*, 1082-1089.
- Catania, C., Binder, E., and Cota, D. (2011). mTORC1 signaling in energy balance and metabolic disease. *Int J Obes (Lond)* *35*, 751-761.
- Chatonnet, F., Flamant, F., and Morte, B. (2015). A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. *Biochim Biophys Acta* *1849*, 122-129.



- Chen, Y., Hu, C., Hsu, C.K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., Hsiung, H.M., Fox, N., Slieker, L.J., Yang, D.D., *et al.* (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* *143*, 2469-2477.
- Cheng, S.Y., Leonard, J.L., and Davis, P.J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* *31*, 139-170.
- Choi, S.J., Kim, F., Schwartz, M.W., and Wisse, B.E. (2010). Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *298*, E1122-1130.
- Christoffolete, M.A., Linardi, C.C., de Jesus, L., Ebina, K.N., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Rabelo, R., Curcio, C., Martins, L., Kimura, E.T., *et al.* (2004). Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* *53*, 577-584.
- Chronwall, B.M. (1985). Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides* *6 Suppl 2*, 1-11.
- Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W., *et al.* (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* *117*, 2325-2336.
- Clemmensen, C., Muller, T.D., Woods, S.C., Berthoud, H.R., Seeley, R.J., and Tschop, M.H. (2017). Gut-Brain Cross-Talk in Metabolic Control. *Cell* *168*, 758-774.
- Clifford, G.M., Londos, C., Kraemer, F.B., Vernon, R.G., and Yeaman, S.J. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* *275*, 5011-5015.
- Cnop, M., Foufelle, F., and Velloso, L.A. (2012). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* *18*, 59-68.
- Coll, A.P. (2007). Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential? *Clin Sci (Lond)* *113*, 171-182.
- Cone, R.D. (2005). Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* *8*, 571-578.
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Jacas, J., Morgan, D.A., Serra, D., Gallego, R., Gonzalez, F., Casals, N., *et al.* (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep* *9*, 366-377.
- Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Seoane-Collazo, P., Martinez-Sanchez, N., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Ferno, J., Tena-Sempere, M., Casals, N., Dieguez, C., *et al.* (2017a).



Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes* 66, 87-99.

Contreras, C., Gonzalez, F., Ferno, J., Dieguez, C., Rahmouni, K., Nogueiras, R., and Lopez, M. (2015). The brain and brown fat. *Ann Med* 47, 150-168.

Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Rahmouni, K., and Lopez, M. (2017b). Traveling from the hypothalamus to the adipose tissue: The thermogenic pathway. *Redox Biol* 12, 854-863.

Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927-930.

Coulombe, P., and Meloche, S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1376-1387.

Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F., and Cone, R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24, 155-163.

Cragle, F.K., and Baldini, G. (2014). Mild lipid stress induces profound loss of MC4R protein abundance and function. *Mol Endocrinol* 28, 357-367.

Crisan, M., Casteilla, L., Lehr, L., Carmona, M., Paoloni-Giacobino, A., Yap, S., Sun, B., Leger, B., Logar, A., Penicaud, L., *et al.* (2008). A reservoir of brown adipocyte progenitors in human skeletal muscle. *Stem Cells* 26, 2425-2433.

Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773, 1358-1375.

Cui, H., Lopez, M., and Rahmouni, K. (2017). The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 13, 338-351.

Cummings, D.E., Frayo, R.S., Marmonier, C., Aubert, R., and Chapelot, D. (2004). Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E297-304.

Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010). Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17, 143-149.

Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., Kuo, F.C., Palmer, E.L., Tseng, Y.H., Doria, A., *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.

Cypess, A.M., Weiner, L.S., Roberts-Toler, C., Franquet Elia, E., Kessler, S.H., Kahn, P.A., English, J., Chatman, K., Trauger, S.A., Doria, A., *et al.* (2015). Activation of human brown adipose tissue by a beta3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab* 21, 33-38.

- Dakin, C.L., Small, C.J., Batterham, R.L., Neary, N.M., Cohen, M.A., Patterson, M., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2004). Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* *145*, 2687-2695.
- Darling, N.J., and Cook, S.J. (2014). The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta* *1843*, 2150-2163.
- de Jesus, L.A., Carvalho, S.D., Ribeiro, M.O., Schneider, M., Kim, S.W., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Bianco, A.C. (2001). The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* *108*, 1379-1385.
- del Barco Barrantes, I., Coya, J.M., Maina, F., Arthur, J.S., and Nebreda, A.R. (2011). Genetic analysis of specific and redundant roles for p38alpha and p38beta MAPKs during mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 12764-12769.
- Dentice, M. (2011). Hedgehog-mediated regulation of thyroid hormone action through iodothyronine deiodinases. *Expert Opin Ther Targets* *15*, 493-504.
- Dentice, M., Luongo, C., Huang, S., Ambrosio, R., Elefante, A., Mirebeau-Prunier, D., Zavacki, A.M., Fenzi, G., Grachtchouk, M., Hutchin, M., *et al.* (2007). Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 14466-14471.
- Dentice, M., and Salvatore, D. (2011). Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation. *J Endocrinol* *209*, 273-282.
- Dolado, I., Swat, A., Ajenjo, N., De Vita, G., Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2007). p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell* *11*, 191-205.
- Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., and Cnop, M. (2008). The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev* *29*, 42-61.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* *21*, 1375-1385.
- Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., and Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* *395*, 535-547.
- Elmquist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* *22*, 221-232.
- Engelman, J.A., Berg, A.H., Lewis, R.Y., Lin, A., Lisanti, M.P., and Scherer, P.E. (1999). Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* *274*, 35630-35638.
- Engelman, J.A., Lisanti, M.P., and Scherer, P.E. (1998). Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* *273*, 32111-32120.

- Erickson, J.C., Hollopeter, G., and Palmiter, R.D. (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* *274*, 1704-1707.
- Fekete, C., Gereben, B., Doleschall, M., Harney, J.W., Dora, J.M., Bianco, A.C., Sarkar, S., Liposits, Z., Rand, W., Emerson, C., *et al.* (2004). Lipopolysaccharide induces type 2 iodothyronine deiodinase in the mediobasal hypothalamus: implications for the nonthyroidal illness syndrome. *Endocrinology* *145*, 1649-1655.
- Fischer, J., Kleinau, G., Muller, A., Kuhnen, P., Zwanziger, D., Kinne, A., Rehders, M., Moeller, L.C., Fuhrer, D., Gruters, A., *et al.* (2015). Modulation of monocarboxylate transporter 8 oligomerization by specific pathogenic mutations. *J Mol Endocrinol* *54*, 39-50.
- Flier, J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* *116*, 337-350.
- Fliers, E., Klieverik, L.P., and Kalsbeek, A. (2010). Novel neural pathways for metabolic effects of thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* *21*, 230-236.
- Fonseca, T.L., Werneck-De-Castro, J.P., Castillo, M., Bocco, B.M., Fernandes, G.W., McAninch, E.A., Ignacio, D.L., Moises, C.C., Ferreira, A.R., Gereben, B., *et al.* (2014). Tissue-specific inactivation of type 2 deiodinase reveals multilevel control of fatty acid oxidation by thyroid hormone in the mouse. *Diabetes* *63*, 1594-1604.
- Freitas, B.C., Gereben, B., Castillo, M., Kallo, I., Zeold, A., Egri, P., Liposits, Z., Zavacki, A.M., Maciel, R.M., Jo, S., *et al.* (2010). Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. *J Clin Invest* *120*, 2206-2217.
- Friedman, J.M. (2009). Obesity: Causes and control of excess body fat. *Nature* *459*, 340-342.
- Friesema, E.C., Visser, T.J., Borgers, A.J., Kalsbeek, A., Swaab, D.F., Fliers, E., and Alkemade, A. (2012). Thyroid hormone transporters and deiodinases in the developing human hypothalamus. *Eur J Endocrinol* *167*, 379-386.
- Friesema, E.C., Visser, W.E., and Visser, T.J. (2010). Genetics and phenomics of thyroid hormone transport by MCT8. *Mol Cell Endocrinol* *322*, 107-113.
- Fujishiro, M., Gotoh, Y., Katagiri, H., Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Funaki, M., Inukai, K., *et al.* (2001). MKK6/3 and p38 MAPK pathway activation is not necessary for insulin-induced glucose uptake but regulates glucose transporter expression. *J Biol Chem* *276*, 19800-19806.
- Fuller, C.A., Horwitz, B.A., and Horowitz, J.M. (1975). Shivering and nonshivering thermogenic responses of cold-exposed rats to hypothalamic warming. *Am J Physiol* *228*, 1519-1524.
- Galas, L., Tonon, M.C., Beaujean, D., Fredriksson, R., Larhammar, D., Lihmann, I., Jegou, S., Fournier, A., Chartrel, N., and Vaudry, H. (2002). Neuropeptide Y inhibits spontaneous alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) release via a Y(5) receptor and

suppresses thyrotropin-releasing hormone-induced alpha-MSH secretion via a Y(1) receptor in frog melanotrope cells. *Endocrinology* 143, 1686-1694.

Garcia, M.C., Lopez, M., Gualillo, O., Seoane, L.M., Dieguez, C., and 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, 1392-1400.

Gardner, B.M., and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* 333, 1891-1894.

Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., and Han, J. (2002). MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291-1294.

Geary, N., Smith, G.P., and 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, 179-186.

Geerling, J.C., Shin, J.W., Chimenti, P.C., and Loewy, A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. *J Comp Neurol* 518, 1460-1499.

Gereben, B., Goncalves, C., Harney, J.W., Larsen, P.R., and Bianco, A.C. (2000). Selective proteolysis of human type 2 deiodinase: a novel ubiquitin-proteasomal mediated mechanism for regulation of hormone activation. *Mol Endocrinol* 14, 1697-1708.

Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeold, A., and Bianco, A.C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29, 898-938.

Goforth, P.B., Leininger, G.M., Patterson, C.M., Satin, L.S., and 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, 11405-11415.

Golozoubova, V., Gullberg, H., Matthias, A., Cannon, B., Vennstrom, B., and Nedergaard, J. (2004). Depressed thermogenesis but competent brown adipose tissue recruitment in mice devoid of all hormone-binding thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 18, 384-401.

Gonzalez-Garcia, I., Contreras, C., Estevez-Salguero, A., Ruiz-Pino, F., Colsh, B., Pensado, I., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Martinez de Morentin, P.B., Ferno, J., *et al.* (2018). Estradiol Regulates Energy Balance by Ameliorating Hypothalamic Ceramide-Induced ER Stress. *Cell Rep* 25, 413-423 e415.

Gonzalez-Garcia, I., Milbank, E., Dieguez, C., Lopez, M., and Contreras, C. (2019). Glucagon, GLP-1 and Thermogenesis. *Int J Mol Sci* 20.

Gonzalez, C.R., Martinez de Morentin, P.B., Martinez-Sanchez, N., Gomez-Diaz, C., Lage, R., Varela, L., Dieguez, C., Nogueiras, R., Castano, J.P., and Lopez, M. (2012). Hyperthyroidism differentially regulates neuropeptide S system in the rat brain. *Brain Res* 1450, 40-48.

- Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* *94*, 206-218.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A., and Hardie, D.G. (2013). AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab* *18*, 556-566.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., and Stark, K.L. (1997). Overexpression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* *17*, 273-274.
- Granneman, J.G. (1988). Norepinephrine infusions increase adenylate cyclase responsiveness in brown adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther* *245*, 1075-1080.
- Guan, X.M., Yu, H., Trumbauer, M., Frazier, E., Van der Ploeg, L.H., and Chen, H. (1998). Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. *Neuroreport* *9*, 3415-3419.
- Guerra, C., Navarro, P., Valverde, A.M., Arribas, M., Bruning, J., Kozak, L.P., Kahn, C.R., and Benito, M. (2001). Brown adipose tissue-specific insulin receptor knockout shows diabetic phenotype without insulin resistance. *J Clin Invest* *108*, 1205-1213.
- Guieu, J.D., and Hardy, J.D. (1970). Effects of heating and cooling of the spinal cord on preoptic unit activity. *J Appl Physiol* *29*, 675-683.
- Gunawardana, S.C., and Piston, D.W. (2012). Reversal of type 1 diabetes in mice by brown adipose tissue transplant. *Diabetes* *61*, 674-682.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* *1*, 271-272.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* *269*, 543-546.
- Hannun, Y.A., and Luberto, C. (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* *10*, 73-80.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* *277*, 25847-25850.
- Haque, M.S., Minokoshi, Y., Hamai, M., Iwai, M., Horiuchi, M., and Shimazu, T. (1999). Role of the sympathetic nervous system and insulin in enhancing glucose uptake in peripheral tissues after intrahypothalamic injection of leptin in rats. *Diabetes* *48*, 1706-1712.
- Hardie, D.G. (2013). The LKB1-AMPK pathway-friend or foe in cancer? *Cancer Cell* *23*, 131-132.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* *5*, 897-904.



- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787-3799.
- Henry, B.A., Rao, A., Ikenasio, B.A., Mountjoy, K.G., Tilbrook, A.J., and Clarke, I.J. (2001). Differential expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and agouti related-protein in chronically food-restricted sheep. *Brain Res* 918, 40-50.
- Hentges, S.T., Low, M.J., and Williams, J.T. (2005). Differential regulation of synaptic inputs by constitutively released endocannabinoids and exogenous cannabinoids. *J Neurosci* 25, 9746-9751.
- Hentges, S.T., Otero-Corchon, V., Pennock, R.L., King, C.M., and Low, M.J. (2009). Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *J Neurosci* 29, 13684-13690.
- Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1942). THE SPONTANEOUS ACTIVITY AND FOOD INTAKE OF RATS WITH HYPOTHALAMIC LESIONS. 136, 609-617.
- Hill, J.W. (2012). PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab* 16, S627-636.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Hogan, S., Coscina, D.V., and Himms-Hagen, J. (1982). Brown adipose tissue of rats with obesity-inducing ventromedial hypothalamic lesions. *Am J Physiol* 243, E338-344.
- Holm, C., Fredrikson, G., Cannon, B., and Belfrage, P. (1987). Hormone-sensitive lipase in brown adipose tissue: identification and effect of cold exposure. *Biosci Rep* 7, 897-904.
- Horvath, T.L., Diano, S., and Tschop, M. (2004). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist* 10, 235-246.
- Horvath, T.L., Diano, S., and 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, 1072-1087.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271, 10697-10703.
- Imai-Matsumura, K., Matsumura, K., and Nakayama, T. (1984). Involvement of ventromedial hypothalamus in brown adipose tissue thermogenesis induced by preoptic cooling in rats. *Jpn J Physiol* 34, 939-943.
- Imbernon, M., Beiroa, D., Vazquez, M.J., Morgan, D.A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., Diaz-Arteaga, A., Senra, A., Busquets, S., Velasquez, D.A., *et al.* (2013). Central melanin-

concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 144, 636-649 e636.

Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., and Oikawa, S. (2003). Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology* 78, 321-330.

Jaburek, M., Varecha, M., Jezek, P., and Garlid, K.D. (2001). Alkylsulfonates as probes of uncoupling protein transport mechanism. Ion pair transport demonstrates that direct H(+) translocation by UCP1 is not necessary for uncoupling. *J Biol Chem* 276, 31897-31905.

Jacobowitz, D.M., and O'Donohue, T.L. (1978). alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 6300-6304.

Jansen, A.S., Hoffman, J.L., and Loewy, A.D. (1997). CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res* 766, 29-38.

Jayarama-Naidu, R., Johannes, J., Meyer, F., Wirth, E.K., Schomburg, L., Kohrle, J., and Renko, K. (2015). A Nonradioactive Uptake Assay for Rapid Analysis of Thyroid Hormone Transporter Function. *Endocrinology* 156, 2739-2745.

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

Jean, A., Conductier, G., Manrique, C., Bouras, C., Berta, P., Hen, R., Charnay, Y., Bockaert, J., and Compan, V. (2007). Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT4 receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16335-16340.

Jespersen, N.Z., Larsen, T.J., Peijs, L., Daugaard, S., Homoe, P., Loft, A., de Jong, J., Mathur, N., Cannon, B., Nedergaard, J., *et al.* (2013). A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 17, 798-805.

Jureus, A., Cunningham, M.J., McClain, M.E., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (2000). Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 141, 2703-2706.

Kageyama, H., Takenoya, F., Shiba, K., and Shioda, S. (2010). Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 44, 133-138.

Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 473-481.

Kajimura, S., and Saito, M. (2014). A new era in brown adipose tissue biology: molecular control of brown fat development and energy homeostasis. *Annu Rev Physiol* 76, 225-249.

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



- Kaptein, E.M., Beale, E., and Chan, L.S. (2009). Thyroid hormone therapy for obesity and nonthyroidal illnesses: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 3663-3675.
- Keipert, S., and Jastroch, M. (2014). Brite/beige fat and UCP1 - is it thermogenesis? *Biochim Biophys Acta* 1837, 1075-1082.
- Kim, B. (2008). Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* 18, 141-144.
- Kim, H.S., Kim, Y., Lim, M.J., Park, Y.G., Park, S.I., and Sohn, J. (2019). The p38-activated ER stress-ATF6 $\alpha$  axis mediates cellular senescence. *FASEB J* 33, 2422-2434.
- Kim, O.K., Jun, W., and Lee, J. (2015). Mechanism of ER Stress and Inflammation for Hepatic Insulin Resistance in Obesity. *Ann Nutr Metab* 67, 218-227.
- Kim, Y., Park, M., Boghossian, S., and York, D.A. (2010). Three weeks voluntary running wheel exercise increases endoplasmic reticulum stress in the brain of mice. *Brain Res* 1317, 13-23.
- Kissileff, H.R., Carretta, J.C., Geliebter, A., and Pi-Sunyer, F.X. (2003). Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R992-998.
- Kjjobsted, R., Hingst, J.R., Fentz, J., Foretz, M., Sanz, M.N., Pehmoller, C., Shum, M., Marette, A., Mounier, R., Treebak, J.T., *et al.* (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB J* 32, 1741-1777.
- Kleiber, M. (1947). Body size and metabolic rate. *Physiol Rev* 27, 511-541.
- Klieverik, L.P., Janssen, S.F., van Riel, A., Foppen, E., Bisschop, P.H., Serlie, M.J., Boelen, A., Ackermans, M.T., Sauerwein, H.P., Fliers, E., *et al.* (2009). Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5966-5971.
- Klieverik, L.P., Sauerwein, H.P., Ackermans, M.T., Boelen, A., Kalsbeek, A., and Fliers, E. (2008). Effects of thyrotoxicosis and selective hepatic autonomic denervation on hepatic glucose metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E513-520.
- Kola, B., Farkas, I., Christ-Crain, M., Wittmann, G., Lolli, F., Amin, F., Harvey-White, J., Liposits, Z., Kunos, G., Grossman, A.B., *et al.* (2008). The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS One* 3, e1797.
- Kola, B., Hubina, E., Tucci, S.A., Kirkham, T.C., Garcia, E.A., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Hawley, S.A., Hardie, D.G., Grossman, A.B., *et al.* (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280, 25196-25201.

- Konner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., *et al.* (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab* 5, 438-449.
- Konner, A.C., Klockener, T., and Bruning, J.C. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav* 97, 632-638.
- Kow, L.M., and Pfaff, D.W. (1991). The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 38, 359-364.
- Krashes, M.J., Shah, B.P., Koda, S., and Lowell, B.B. (2013). Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab* 18, 588-595.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., *et al.* (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72-76.
- Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Yang, D.D., Liao, G., Schloemer, A.J., Dong, C., Bao, J., Banasiak, K.J., Haddad, G.G., Flavell, R.A., *et al.* (2003). A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15184-15189.
- Kwon Jeong, J., Dae Kim, J., and Diano, S. (2013). Ghrelin regulates hypothalamic prolyl carboxypeptidase expression in mice. *Mol Metab* 2, 23-30.
- Labbe, S.M., Caron, A., Lanfray, D., Monge-Rofarello, B., Bartness, T.J., and Richard, D. (2015). Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Syst Neurosci* 9, 150.
- Lage, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., and Lopez, M. (2008). AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* 14, 539-549.
- Lage, R., Vazquez, M.J., Varela, L., Saha, A.K., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Dieguez, C., and Lopez, M. (2010). Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender. *FASEB J* 24, 2670-2679.
- Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., and Kuhar, M.J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29, 293-298.
- Landsberg, L., Young, J.B., Leonard, W.R., Linsenmeier, R.A., and Turek, F.W. (2009). Is obesity associated with lower body temperatures? Core temperature: a forgotten variable in energy balance. *Metabolism* 58, 871-876.
- Lanna, A., Henson, S.M., Escors, D., and Akbar, A.N. (2014). The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol* 15, 965-972.

- Lee, H.S., Hwang, C.Y., Shin, S.Y., Kwon, K.S., and Cho, K.H. (2014). MLK3 is part of a feedback mechanism that regulates different cellular responses to reactive oxygen species. *Sci Signal* 7, ra52.
- Lee, J., and Ozcan, U. (2014). Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J Biol Chem* 289, 1203-1211.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16, 452-466.
- Lee, Y., Hirose, H., Ohneda, M., Johnson, J.H., McGarry, J.D., and Unger, R.H. (1994). Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10878-10882.
- Lefloch, R., Pouyssegur, J., and Lenormand, P. (2009). Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle* 8, 705-711.
- Leibel, R.L., Rosenbaum, M., and Hirsch, J. (1995). Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* 332, 621-628.
- Lelliott, C., and Vidal-Puig, A.J. (2004). Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis de novo and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 4, S22-28.
- Li, C., Chen, P., and 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, 122-129.
- Li, L., Feng, Z., and Porter, A.G. (2004). JNK-dependent phosphorylation of c-Jun on serine 63 mediates nitric oxide-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 279, 4058-4065.
- Liao, G.Y., An, J.J., Gharami, K., Waterhouse, E.G., Vanevski, F., Jones, K.R., and Xu, B. (2012). Dendritically targeted Bdnf mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nat Med* 18, 564-571.
- Lidell, M.E., Betz, M.J., Dahlqvist Leinhard, O., Heglind, M., Elander, L., Slawik, M., Mussack, T., Nilsson, D., Romu, T., Nuutila, P., *et al.* (2013). Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 19, 631-634.
- Lidell, M.E., Betz, M.J., and Enerback, S. (2014). Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte* 3, 63-66.
- Lindberg, D., Chen, P., and Li, C. (2013). Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *J Comp Neurol* 521, 3167-3190.

- Little, J.W. (2006). Thyroid disorders. Part I: hyperthyroidism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101, 276-284.
- Lopez, M. (2017). EJE PRIZE 2017: Hypothalamic AMPK: a golden target against obesity? *Eur J Endocrinol* 176, R235-R246.
- Lopez, M. (2018). AMPK Wars: the VMH Strikes Back, Return of the PVH. *Trends Endocrinol Metab* 29, 135-137.
- Lopez, M., Alvarez, C.V., Nogueiras, R., and Dieguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends Mol Med* 19, 418-427.
- Lopez, M., Lage, R., Saha, A.K., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S., Tovar, S., Raghay, K., Rodriguez-Cuenca, S., *et al.* (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7, 389-399.
- Lopez, M., Lage, R., Tung, Y.C., Challis, B.G., Varela, L., Virtue, S., O'Rahilly, S., Vidal-Puig, A., Dieguez, C., and Coll, A.P. (2007a). Orexin expression is regulated by alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Neuroendocrinol* 19, 703-707.
- Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., and Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol* 12, 421-432.
- Lopez, M., Seoane, L., Garcia, M.C., Lago, F., Casanueva, F.F., Senaris, R., and Dieguez, C. (2000). Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 41-45.
- Lopez, M., and Tena-Sempere, M. (2015). Estrogens and the control of energy homeostasis: a brain perspective. *Trends Endocrinol Metab* 26, 411-421.
- Lopez, M., and Tena-Sempere, M. (2016). Estradiol and brown fat. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 30, 527-536.
- Lopez, M., and Tena-Sempere, M. (2017). Estradiol effects on hypothalamic AMPK and BAT thermogenesis: A gateway for obesity treatment? *Pharmacol Ther* 178, 109-122.
- Lopez, M., Tovar, S., Vazquez, M.J., Williams, L.M., and Dieguez, C. (2007b). Peripheral tissue-brain interactions in the regulation of food intake. *Proc Nutr Soc* 66, 131-155.
- Lopez, M., Varela, L., Vazquez, M.J., Rodriguez-Cuenca, S., Gonzalez, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R., *et al.* (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat Med* 16, 1001-1008.
- Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.
- Ma, Y., Brewer, J.W., Diehl, J.A., and Hendershot, L.M. (2002). Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol* 318, 1351-1365.

- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., *et al.* (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* *1*, 1155-1161.
- Marrif, H., Schifman, A., Stepanyan, Z., Gillis, M.A., Calderone, A., Weiss, R.E., Samarut, J., and Silva, J.E. (2005). Temperature homeostasis in transgenic mice lacking thyroid hormone receptor-alpha gene products. *Endocrinology* *146*, 2872-2884.
- Martagon, A.J., Philips, K.J., and Webb, P. (2013). Opening the black box: revealing the molecular basis of thyroid hormone transport. *Endocrinology* *154*, 2266-2269.
- Martinez-Sanchez, N., Moreno-Navarrete, J.M., Contreras, C., Rial-Pensado, E., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Fernandez-Real, J.M., and Lopez, M. (2017a). Thyroid hormones induce browning of white fat. *J Endocrinol* *232*, 351-362.
- Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buque, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T.C., Vazquez-Martinez, R., *et al.* (2017b). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab* *26*, 212-229 e212.
- Martinez de Mena, R., Scanlan, T.S., and Obregon, M.J. (2010). The T3 receptor beta1 isoform regulates UCP1 and D2 deiodinase in rat brown adipocytes. *Endocrinology* *151*, 5074-5083.
- Martinez de Morentin, P.B., Gonzalez-Garcia, I., Martins, L., Lage, R., Fernandez-Mallo, D., Martinez-Sanchez, N., Ruiz-Pino, F., Liu, J., Morgan, D.A., Pinilla, L., *et al.* (2014a). Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab* *20*, 41-53.
- Martinez de Morentin, P.B., Lage, R., Gonzalez-Garcia, I., Ruiz-Pino, F., Martins, L., Fernandez-Mallo, D., Gallego, R., Ferno, J., Senaris, R., Saha, A.K., *et al.* (2015). Pregnancy induces resistance to the anorectic effect of hypothalamic malonyl-CoA and the thermogenic effect of hypothalamic AMPK inhibition in female rats. *Endocrinology* *156*, 947-960.
- Martinez de Morentin, P.B., Martinez-Sanchez, N., Roa, J., Ferno, J., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., and Lopez, M. (2014b). Hypothalamic mTOR: the rookie energy sensor. *Curr Mol Med* *14*, 3-21.
- Martinez de Morentin, P.B., Varela, L., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., and Lopez, M. (2010). Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta* *1801*, 350-361.
- Martins, L., Fernandez-Mallo, D., Novelle, M.G., Vazquez, M.J., Tena-Sempere, M., Nogueiras, R., Lopez, M., and Dieguez, C. (2012). Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One* *7*, e46923.
- Martins, L., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Gonzalez-Garcia, I., Martinez-Sanchez, N., Gonzalez, F., Zalvide, J., Gallego, R., Dieguez, C., Nogueiras, R., *et al.* (2016). A Functional Link between AMPK and Orexin Mediates the Effect of BMP8B on Energy Balance. *Cell Rep* *16*, 2231-2242.



- Matesanz, N., Bernardo, E., Acin-Perez, R., Manieri, E., Perez-Sieira, S., Hernandez-Cosido, L., Montalvo-Romeral, V., Mora, A., Rodriguez, E., Leiva-Vega, L., *et al.* (2017). MKK6 controls T3-mediated browning of white adipose tissue. *Nat Commun* 8, 856.
- Matesanz, N., Nikolic, I., Leiva, M., Pulgarin-Alfaro, M., Santamans, A.M., Bernardo, E., Mora, A., Herrera-Melle, L., Rodriguez, E., Beiroa, D., *et al.* (2018). p38alpha blocks brown adipose tissue thermogenesis through p38delta inhibition. *PLoS Biol* 16, e2004455.
- Mayer, C.M., and Belsham, D.D. (2010). Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* 151, 576-585.
- Mayerl, S., Muller, J., Bauer, R., Richert, S., Kassmann, C.M., Darras, V.M., Buder, K., Boelen, A., Visser, T.J., and Heuer, H. (2014). Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J Clin Invest* 124, 1987-1999.
- McFadden, J.W., Aja, S., Li, Q., Bandaru, V.V., Kim, E.K., Haughey, N.J., Kuhajda, F.P., and Ronnett, G.V. (2014). Increasing fatty acid oxidation remodels the hypothalamic neurometabolome to mitigate stress and inflammation. *PLoS One* 9, e115642.
- Mebis, L., and van den Berghe, G. (2009). The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness. *Neth J Med* 67, 332-340.
- Mebis, L., and Van den Berghe, G. (2011). Thyroid axis function and dysfunction in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25, 745-757.
- Medina-Gomez, G., Gray, S., and Vidal-Puig, A. (2007). Adipogenesis and lipotoxicity: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and PPARgamma coactivator-1 (PGC1). *Public Health Nutr* 10, 1132-1137.
- Meister, B., Gomuc, B., Suarez, E., Ishii, Y., Durr, K., and Gillberg, L. (2006). Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur J Neurosci* 24, 2731-2740.
- Mercer, R.E., Chee, M.J., and Colmers, W.F. (2011). The role of NPY in hypothalamic mediated food intake. *Front Neuroendocrinol* 32, 398-415.
- Meyer, C.W., Willershauser, M., Jastroch, M., Rourke, B.C., Fromme, T., Oelkrug, R., Heldmaier, G., and Klingenspor, M. (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R1396-1406.
- Milton, J.S. (2007). *Estadística para biología y ciencias de la salud.* (McGraw-Hill Interamericana de España S.L.).
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., *et al.* (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.

- Morimoto, C., Kameda, K., Tsujita, T., and Okuda, H. (2001). Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res* 42, 120-127.
- Moriyama, K., Yamamoto, H., Futawaka, K., Atake, A., Kasahara, M., and Tagami, T. (2016). Molecular characterization of human thyroid hormone receptor beta isoform 4. *Endocr Res* 41, 34-42.
- Morrison, S.D., Barnett, R.J., and Mayer, J. (1958). Localization of lesions in the lateral hypothalamus of rats with induced adipsia and aphagia. *Am J Physiol* 193, 230-234.
- Muller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., *et al.* (2015). Ghrelin. *Mol Metab* 4, 437-460.
- Nakamura, K. (2011). Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, R1207-1228.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.
- Nedergaard, J., and Lindberg, O. (1982). The brown fat cell. *Int Rev Cytol* 74, 187-286.
- Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.C., Zolotukhin, S., *et al.* (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS One* 7, e40191.
- Nguyen, T.T., Chapa, F., and DiStefano, J.J., 3rd (1998). Direct measurement of the contributions of type I and type II 5'-deiodinases to whole body steady state 3,5,3'-triiodothyronine production from thyroxine in the rat. *Endocrinology* 139, 4626-4633.
- Nicholls, D.G. (1974). Hamster brown-adipose-tissue mitochondria. The chloride permeability of the inner membrane under respiring conditions, the influence of purine nucleotides. *Eur J Biochem* 49, 585-593.
- Nijenhuis, W.A., Oosterom, J., and Adan, R.A. (2001). AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol* 15, 164-171.
- Nogueiras, R., Gallego, R., Gualillo, O., Caminos, J.E., Garcia-Caballero, T., Casanueva, F.F., and Dieguez, C. (2003a). Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* 548, 21-27.
- Nogueiras, R., Gualillo, O., Caminos, J.E., Casanueva, F.F., and Dieguez, C. (2003b). Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res* 11, 408-414.
- O'Neill, H.M., Maarbjerg, S.J., Crane, J.D., Jeppesen, J., Jorgensen, S.B., Schertzer, J.D., Shyroka, O., Kiens, B., van Denderen, B.J., Tarnopolsky, M.A., *et al.* (2011). AMP-activated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in



maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16092-16097.

Oakhill, J.S., Scott, J.W., and Kemp, B.E. (2012). AMPK functions as an adenylate charge-regulated protein kinase. *Trends Endocrinol Metab* 23, 125-132.

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

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

OMS (2020). Salud.

Palkovits, M. (2003). Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyogy Sz* 56, 288-302.

Pandit, R., de Jong, J.W., Vanderschuren, L.J., and Adan, R.A. (2011). Neurobiology of overeating and obesity: the role of melanocortins and beyond. *Eur J Pharmacol* 660, 28-42.

Paranjape, S.A., Chan, O., Zhu, W., Horblitt, A.M., McNay, E.C., Cresswell, J.A., Bogan, J.S., McCrimmon, R.J., and Sherwin, R.S. (2010). Influence of insulin in the ventromedial hypothalamus on pancreatic glucagon secretion in vivo. *Diabetes* 59, 1521-1527.

Pearce, E.N. (2012a). Thyroid hormone and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19, 408-413.

Pearce, E.N. (2012b). Update in lipid alterations in subclinical hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 326-333.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.

Perez-Tilve, D., Nogueiras, R., Mallo, F., Benoit, S.C., and Tschoep, M. (2006). Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy balance [corrected] and metabolism. *Endocrine* 29, 61-71.

Perkins, M.N., Rothwell, N.J., Stock, M.J., and Stone, T.W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature* 289, 401-402.

Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 285, 7153-7164.

Pijl, H., de Meijer, P.H., Langius, J., Coenegracht, C.I., van den Berk, A.H., Chandie Shaw, P.K., Boom, H., Schoemaker, R.C., Cohen, A.F., Burggraaf, J., *et al.* (2001). Food choice in

hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5848-5853.

Piperi, C., Adamopoulos, C., Dalagiorgou, G., Diamanti-Kandarakis, E., and Papavassiliou, A.G. (2012). Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 2231-2242.

Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., *et al.* (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1003-1012.

Preston, E., Triandafillou, J., and Haas, N. (1989). Colchicine lesions of ventromedial hypothalamus: effects on regulatory thermogenesis in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 32, 301-307.

Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243-247.

Ramadan, W., Marsili, A., Larsen, P.R., Zavacki, A.M., and Silva, J.E. (2011). Type-2 iodothyronine 5'deiodinase (D2) in skeletal muscle of C57Bl/6 mice. II. Evidence for a role of D2 in the hypermetabolism of thyroid hormone receptor alpha-deficient mice. *Endocrinology* 152, 3093-3102.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100-3112.

Ramirez, S., and Claret, M. (2015). Hypothalamic ER stress: A bridge between leptin resistance and obesity. *FEBS Lett* 589, 1678-1687.

Raposo, P.D., Pierroz, D.D., Broqua, P., White, R.B., Pedrazzini, T., and Aubert, M.L. (2001). Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol* 185, 195-204.

Ravussin, Y., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2014). A missing link in body weight homeostasis: the catabolic signal of the overfed state. *Cell Metab* 20, 565-572.

Refetoff, S., Bassett, J.H., Beck-Peccoz, P., Bernal, J., Brent, G., Chatterjee, K., De Groot, L.J., Dumitrescu, A.M., Jameson, J.L., Kopp, P.A., *et al.* (2014). Classification and proposed nomenclature for inherited defects of thyroid hormone action, cell transport, and metabolism. *Eur Thyroid J* 3, 7-9.

Ribeiro, M.O., Bianco, S.D., Kaneshige, M., Schultz, J.J., Cheng, S.Y., Bianco, A.C., and Brent, G.A. (2010). Expression of uncoupling protein 1 in mouse brown adipose tissue is thyroid hormone receptor-beta isoform specific and required for adaptive thermogenesis. *Endocrinology* 151, 432-440.

- Robbins, D.J., Zhen, E., Owaki, H., Vanderbilt, C.A., Ebert, D., Geppert, T.D., and Cobb, M.H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *J Biol Chem* 268, 5097-5106.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A.S., Duffraisse, M., and Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 17, 554-556.
- Romero-Pico, A., Sanchez-Rebordelo, E., Imbernon, M., Gonzalez-Touceda, D., Folgueira, C., Senra, A., Ferno, J., Blouet, C., Cabrera, R., van Gestel, M., *et al.* (2018). Melanin-Concentrating Hormone acts through hypothalamic kappa opioid system and p70S6K to stimulate acute food intake. *Neuropharmacology* 130, 62-70.
- Ropelle, E.R., Flores, M.B., Cintra, D.E., Rocha, G.Z., Pauli, J.R., Morari, J., de Souza, C.T., Moraes, J.C., Prada, P.O., Guadagnini, D., *et al.* (2010). IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 8.
- Rose, B.A., Force, T., and Wang, Y. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev* 90, 1507-1546.
- Rosen, E.D., and MacDougald, O.A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896.
- Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.
- Rosene, M.L., Wittmann, G., Arrojo e Drigo, R., Singru, P.S., Lechan, R.M., and Bianco, A.C. (2010). Inhibition of the type 2 iodothyronine deiodinase underlies the elevated plasma TSH associated with amiodarone treatment. *Endocrinology* 151, 5961-5970.
- Roskoski, R., Jr. (2010). RAF protein-serine/threonine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 399, 313-317.
- Roskoski, R., Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Rothwell, N.J., and Stock, M.J. (1982). Energy expenditure of 'cafeteria'-fed rats determined from measurements of energy balance and indirect calorimetry. *J Physiol* 328, 371-377.
- Saltiel, A.R., and Kahn, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Sanders, M.J., Grondin, P.O., Hegarty, B.D., Snowden, M.A., and Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403, 139-148.
- Saper, C.B., and Lowell, B.B. (2014). The hypothalamus. *Curr Biol* 24, R1111-1116.

- Savage, D.B., Sewter, C.P., Klenk, E.S., Segal, D.G., Vidal-Puig, A., Considine, R.V., and O'Rahilly, S. (2001). Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50, 2199-2202.
- Sawai, H., and Hannun, Y.A. (1999). Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem Phys Lipids* 102, 141-147.
- Schneeberger, M., and Claret, M. (2012). Recent Insights into the Role of Hypothalamic AMPK Signaling Cascade upon Metabolic Control. *Front Neurosci* 6, 185.
- Schneeberger, M., Gomis, R., and Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol* 220, T25-46.
- Schneider, M.J., Fiering, S.N., Pallud, S.E., Parlow, A.F., St Germain, D.L., and Galton, V.A. (2001). Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol* 15, 2137-2148.
- Schneider, M.J., Fiering, S.N., Thai, B., Wu, S.Y., St Germain, E., Parlow, A.F., St Germain, D.L., and Galton, V.A. (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147, 580-589.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961-967.
- Segal, J.P., Stallings, N.R., Lee, C.E., Zhao, L., Socci, N., Viale, A., Harris, T.M., Soares, M.B., Childs, G., Elmquist, J.K., *et al.* (2005). Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurosci* 25, 4181-4188.
- Seoane-Collazo, P., Ferno, J., Gonzalez, F., Dieguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., and Lopez, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine* 50, 276-291.
- Seoane-Collazo, P., Linares-Pose, L., Rial-Pensado, E., Romero-Pico, A., Moreno-Navarrete, J.M., Martinez-Sanchez, N., Garrido-Gil, P., Iglesias-Rey, R., Morgan, D.A., Tomasini, N., *et al.* (2019). Central nicotine induces browning through hypothalamic kappa opioid receptor. *Nat Commun* 10, 4037.
- Seoane-Collazo, P., Martinez de Morentin, P.B., Ferno, J., Dieguez, C., Nogueiras, R., and Lopez, M. (2014). Nicotine improves obesity and hepatic steatosis and ER stress in diet-induced obese male rats. *Endocrinology* 155, 1679-1689.
- Shabalina, I.G., Petrovic, N., de Jong, J.M., Kalinovich, A.V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2013). UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep* 5, 1196-1203.

- Sharp, L.Z., Shinoda, K., Ohno, H., Scheel, D.W., Tomoda, E., Ruiz, L., Hu, H., Wang, L., Pavlova, Z., Gilsanz, V., *et al.* (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* 7, e49452.
- Shen, M., Wang, L., Yang, G., Gao, L., Wang, B., Guo, X., Zeng, C., Xu, Y., Shen, L., Cheng, K., *et al.* (2014). Baicalin protects the cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis: inhibition of CHOP through induction of endothelial nitric oxide synthase. *PLoS One* 9, e88389.
- Sheridan, D.L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N., and Turk, B.E. (2008). Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem* 283, 19511-19520.
- Shih, M.F., and 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, 601-608.
- Shimazu, T., and Amakawa, A. (1968). Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. 3. Differential effects of sympathetic-nerve stimulation and of catecholamines on liver phosphorylase. *Biochim Biophys Acta* 165, 349-356.
- Shimazu, T., Fukuda, A., and Ban, T. (1966). Reciprocal influences of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose level and liver glycogen content. *Nature* 210, 1178-1179.
- Shimazu, T., and Minokoshi, Y. (2017). Systemic Glucoregulation by Glucose-Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamic Nucleus (VMH). *J Endocr Soc* 1, 449-459.
- Shimazu, T., Sudo, M., Minokoshi, Y., and Takahashi, A. (1991). Role of the hypothalamus in insulin-independent glucose uptake in peripheral tissues. *Brain Res Bull* 27, 501-504.
- Silva, J.E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 86, 435-464.
- Simpson, K.A., Martin, N.M., and Bloom, S.R. (2009). Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53, 120-128.
- Sims, E.A., Danforth, E., Jr., Horton, E.S., Bray, G.A., Glennon, J.A., and Salans, L.B. (1973). Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog Horm Res* 29, 457-496.
- Sjogren, M., Alkemade, A., Mittag, J., Nordstrom, K., Katz, A., Rozell, B., Westerblad, H., Arner, A., and Vennstrom, B. (2007). Hypermetabolism in mice caused by the central action of an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *EMBO J* 26, 4535-4545.
- Skarulis, M.C., Celi, F.S., Mueller, E., Zemskova, M., Malek, R., Hugendubler, L., Cochran, C., Solomon, J., Chen, C., and Gorden, P. (2010). Thyroid hormone induced brown adipose tissue and amelioration of diabetes in a patient with extreme insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 256-262.



- Solomon, D.H., Massarotti, E., Garg, R., Liu, J., Canning, C., and Schneeweiss, S. (2011). Association between disease-modifying antirheumatic drugs and diabetes risk in patients with rheumatoid arthritis and psoriasis. *JAMA* 305, 2525-2531.
- Somwar, R., Koterski, S., Sweeney, G., Sciotti, R., Djuric, S., Berg, C., Trevillyan, J., Scherer, P.E., Rondinone, C.M., and Klip, A. (2002). A dominant-negative p38 MAPK mutant and novel selective inhibitors of p38 MAPK reduce insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes without affecting GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 277, 50386-50395.
- Song, C.K., Vaughan, C.H., Keen-Rhinehart, E., Harris, R.B., Richard, D., and 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, R417-428.
- Stanley, S., Pinto, S., Segal, J., Perez, C.A., Viale, A., DeFalco, J., Cai, X., Heisler, L.K., and 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, 7024-7029.
- Sternson, S.M., and Atasoy, D. (2014). Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. *Neuroendocrinology* 100, 95-102.
- Sudo, M., Minokoshi, Y., and Shimazu, T. (1991). Ventromedial hypothalamic stimulation enhances peripheral glucose uptake in anesthetized rats. *Am J Physiol* 261, E298-303.
- Sumara, G., Formentini, I., Collins, S., Sumara, I., Windak, R., Bodenmiller, B., Ramracheya, R., Caille, D., Jiang, H., Platt, K.A., *et al.* (2009). Regulation of PKD by the MAPK p38delta in insulin secretion and glucose homeostasis. *Cell* 136, 235-248.
- Summers, S.A., Garza, L.A., Zhou, H., and Birnbaum, M.J. (1998). Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18, 5457-5464.
- Sutton, A.K., Myers, M.G., Jr., and Olson, D.P. (2016). The Role of PVH Circuits in Leptin Action and Energy Balance. *Annu Rev Physiol* 78, 207-221.
- Tanida, M., Yamamoto, N., Shibamoto, T., and Rahmouni, K. (2013). Involvement of hypothalamic AMP-activated protein kinase in leptin-induced sympathetic nerve activation. *PLoS One* 8, e56660.
- Tatemoto, K., Carlquist, M., and Mutt, V. (1982). Neuropeptide Y--a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature* 296, 659-660.
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M.L., Gonzalez, L.C., Gaytan, F., Zhang, F.P., Caminos, J.E., Pinilla, L., Casanueva, F.F., Dieguez, C., and Aguilar, E. (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143, 717-725.
- Teramoto, H., Coso, O.A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T., and Gutkind, J.S. (1996). Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-

activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* 271, 27225-27228.

Thim, L., Kristensen, P., Larsen, P.J., and Wulff, B.S. (1998). CART, a new anorectic peptide. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 1281-1284.

Thuerauf, D.J., Arnold, N.D., Zechner, D., Hanford, D.S., DeMartin, K.M., McDonough, P.M., Prywes, R., and Glembotski, C.C. (1998). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *J Biol Chem* 273, 20636-20643.

Timmons, J.A., Wennmalm, K., Larsson, O., Walden, T.B., Lassmann, T., Petrovic, N., Hamilton, D.L., Gimeno, R.E., Wahlestedt, C., Baar, K., *et al.* (2007). Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4401-4406.

Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12, 1812-1824.

Trempolec, N., Dave-Coll, N., and Nebreda, A.R. (2013). SnapShot: p38 MAPK substrates. *Cell* 152, 924-924 e921.

Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.

Tschop, M., Wawarta, R., Riepl, R.L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., and Folwaczny, C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24, RC19-21.

Tschop, M.H., Finan, B., Clemmensen, C., Gelfanov, V., Perez-Tilve, D., Muller, T.D., and DiMarchi, R.D. (2016). Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. *Cell Metab* 24, 51-62.

Tseng, Y.H., Kokkotou, E., Schulz, T.J., Huang, T.L., Winnay, J.N., Taniguchi, C.M., Tran, T.T., Suzuki, R., Espinoza, D.O., Yamamoto, Y., *et al.* (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000-1004.

Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., *et al.* (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69-72.

Unger, R.H. (2002). Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53, 319-336.

Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389, 610-614.



- van Marken Lichtenbelt, W.D., and Schrauwen, P. (2011). Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301, R285-296.
- Varela, L., and Horvath, T.L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 13, 1079-1086.
- Varela, L., Martinez-Sanchez, N., Gallego, R., Vazquez, M.J., Roa, J., Gandara, M., Schoenmakers, E., Nogueiras, R., Chatterjee, K., Tena-Sempere, M., *et al.* (2012). Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *J Pathol* 227, 209-222.
- Viala, E., and Pouyssegur, J. (2004). Regulation of tumor cell motility by ERK mitogen-activated protein kinases. *Ann N Y Acad Sci* 1030, 208-218.
- Villarroya, F., and Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metab* 17, 638-643.
- Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N.J., Enerback, S., *et al.* (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360, 1518-1525.
- Visser, W.E., Friesema, E.C., Jansen, J., and Visser, T.J. (2008). Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab* 19, 50-56.
- Vlaeminck-Guillem, V., Espiard, S., Flamant, F., and Wemeau, J.L. (2015). TRalpha receptor mutations extend the spectrum of syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone. *Presse Med* 44, 1103-1112.
- Vrang, N., Larsen, P.J., Clausen, J.T., and Kristensen, P. (1999). Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19, RC5.
- Wada, T., and Penninger, J.M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23, 2838-2849.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086.
- Wang, S., and Kaufman, R.J. (2012). The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 197, 857-867.
- Warner, A., and Mittag, J. (2012). Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *J Mol Endocrinol* 49, R29-35.
- Weaver, J.U. (2008). Classical endocrine diseases causing obesity. *Front Horm Res* 36, 212-228.

- Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S., *et al.* (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. *Cell* *149*, 871-885.
- Whittle, A.J., Lopez, M., and Vidal-Puig, A. (2011). Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med* *17*, 405-411.
- Wikstrom, L., Johansson, C., Salto, C., Barlow, C., Campos Barros, A., Baas, F., Forrest, D., Thoren, P., and Vennstrom, B. (1998). Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *EMBO J* *17*, 455-461.
- Williams, G.R. (2000). Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* *20*, 8329-8342.
- Williams, L.M. (2012). Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc* *71*, 521-533.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., and Carling, D. (2003a). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* *13*, 2004-2008.
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2003b). Insulin and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* *9*, 795-800.
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L.M., Ye, L., Choi, J.H., Giang, A.H., Khandekar, M., Virtanen, K.A., Nuutila, P., Schaart, G., *et al.* (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* *150*, 366-376.
- Wu, Y., and Koenig, R.J. (2000). Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* *11*, 207-211.
- Xiong, Y., Collins, Q.F., An, J., Lupo, E., Jr., Liu, H.Y., Liu, D., Robidoux, J., Liu, Z., and Cao, W. (2007). p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. *J Biol Chem* *282*, 4975-4982.
- Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., and Reichardt, L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* *6*, 736-742.
- Yamanaka, A., Tabuchi, S., Tsunematsu, T., Fukazawa, Y., and Tominaga, M. (2010). Orexin directly excites orexin neurons through orexin 2 receptor. *J Neurosci* *30*, 12642-12652.
- Yan, B.C., Adachi, T., and Tsubata, T. (2008). ER stress is involved in B cell antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* *365*, 143-148.
- Yang, G., Badeanlou, L., Bielawski, J., Roberts, A.J., Hannun, Y.A., and Samad, F. (2009). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *297*, E211-224.
- Yang, L., and Hotamisligil, G.S. (2008). Stressing the brain, fattening the body. *Cell* *135*, 20-22.

- Yehuda-Shnaidman, E., Kalderon, B., and Bar-Tana, J. (2014). Thyroid hormone, thyromimetics, and metabolic efficiency. *Endocr Rev* 35, 35-58.
- Yeo, G.S., and Heisler, L.K. (2012). Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat Neurosci* 15, 1343-1349.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001a). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2001b). Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 21, 1239-1248.
- Zarubin, T., and Han, J. (2005). Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15, 11-18.
- Zhang, C.S., Hawley, S.A., Zong, Y., Li, M., Wang, Z., Gray, A., Ma, T., Cui, J., Feng, J.W., Zhu, M., *et al.* (2017). Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* 548, 112-116.
- Zhang, C.S., Jiang, B., Li, M., Zhu, M., Peng, Y., Zhang, Y.L., Wu, Y.Q., Li, T.Y., Liang, Y., Lu, Z., *et al.* (2014). The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell Metab* 20, 526-540.
- Zhang, S., Cao, H., Li, Y., Jing, Y., Liu, S., Ye, C., Wang, H., Yu, S., Peng, C., Hui, L., *et al.* (2018). Metabolic benefits of inhibition of p38alpha in white adipose tissue in obesity. *PLoS Biol* 16, e2004225.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9-18.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhang, Y.L., Guo, H., Zhang, C.S., Lin, S.Y., Yin, Z., Peng, Y., Luo, H., Shi, Y., Lian, G., Zhang, C., *et al.* (2013). AMP as a low-energy charge signal autonomously initiates assembly of AXIN-AMPK-LKB1 complex for AMPK activation. *Cell Metab* 18, 546-555.
- Zheng, C.F., and Guan, K.L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *EMBO J* 13, 1123-1131.
- Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., and Unger, R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1784-1789.
- Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., and Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose

tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. FASEB J 23, 3113-3120.





# ANEXOS









## RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

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

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

### ANTECEDENTES

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

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

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

**Persoa responsable do proxecto:** Miguel Anotnio López Pérez

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

**Clasificación do proxecto :** Tipo I  Tipo II  Tipo III

### CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

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

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





3 O Servizo de Gandaría da Coruña revisou a documentación achegada na solicitude e o resultado favorable da avaliación do proxecto realizada polo órgano habilitado, a Sección de Experimentación Animal do Comité de Bioética da Universidade de Santiago de Compostela.

Esta xefatura territorial é competente para ditar unha resolución, de conformidade co Decreto 149/2018, do 5 de decembro, polo que se establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural e se modifica parcialmente o Decreto 177/2016, do 15 de decembro, polo que se fixa a estrutura orgánica da Vicepresidencia e das consellerías da Xunta de Galicia (DOG 235, do 11 de novembro).

De acordo con todo o indicado, RESOLVO:

- 1 Autorizar o proxecto solicitado.
- 2 O proxecto precisa someterse a unha avaliación retrospectiva cando este finalice.
- 3 A autorización deste proxecto terá unha duración de cinco anos e unha vez transcorrido este tempo deberá ser renovada.

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

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala, previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpoñer un recurso de alzada ante o conselleiro de Medio Rural. O prazo comezará a contar dende o día seguinte ao da recepción desta resolución. Todo isto, segundo o disposto nos artigos 121 e 122 da citada Lei 39/2015.

Mediante este escrito notifícasele a Anxo Vidal Figueroa esta resolución segundo o esixido no artigo 40.1 da antedita Lei 39/2015.





