



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

# **Regulación central del balance energético por hormonas tiroideas**

**TESIS DOCTORAL**

**Noelia Martínez Sánchez**

**Santiago de Compostela, 2015**



**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**Dr. Miguel A. López Pérez**, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

**Prof. Dr. Carlos Diéguez González**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela

Certifican que:

la presente Tesis Doctoral titulada, “**Regulación central del balance energético por hormonas tiroideas**” elaborada por **Noelia Martínez Sánchez**, ha sido realizada bajo su dirección en los Laboratorios de Neurociencia “Ramón Domínguez” del Departamento de Fisiología de la Universidad de Santiago de Compostela y en el Centro de Investigaciones en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS) de la Universidad de Santiago de Compostela, estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela, 2015

Fdo.: **Dr. Miguel A. López Pérez**

Fdo.: **Dr. Carlos Diéguez González**

**Santiago de Compostela, Noviembre 2015**

## INDICE

RESUMEN .....	1
Datos y cifras.....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
HOMEOSTASIS ENERGÉTICA: las señales periféricas .....	7
Señales de saciedad .....	8
EL HIPOTÁLAMO.....	9
El núcleo arcuato.....	10
El núcleo ventromedial del hipotálamo .....	13
El núcleo paraventricular .....	15
El núcleo dorsomedial.....	16
El área hipotalámica lateral.....	17
METABOLISMO LIPÍDICO .....	18
LIPOTOXICIDAD Y ER ESTRÉS .....	23
SENSORES ENERGÉTICOS .....	29
AMPK.....	29
KINASAS C-JUN AMINO TERMINALES ( <i>JUN amino-terminal kinases</i> , JNKs) .....	34
TERMOGÉNESIS: el tejido adiposo pardo.....	37
LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	43
Las hormonas tiroideas y el metabolismo .....	47
Las hormonas tiroideas: termogénesis y gasto energético.....	47
Las hormonas tiroideas y la ingesta .....	49
Hormonas tiroideas y metabolismo de la glucosa en el hígado .....	50
OBJETIVOS.....	53
MATERIAL Y MÉTODOS .....	57
MODELOS ANIMALES Y CUIDADOS .....	59
ANESTESIA Y ANALGESIA.....	60

VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS .....	61
1) Vía intraperitoneal (IP) .....	61
2) Vía subcutánea (SC).....	61
3) Vía intracerebroventricular (ICV) .....	62
4) Vía núcleo-específica.....	62
PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS.....	63
Monitorización de la ingesta y de la masa corporal.....	63
Determinación de la composición corporal .....	63
Preparación de mini bombas osmóticas .....	63
PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS.....	64
Canulación ICV.....	64
Estereotaxia núcleo-específica.....	65
Registro de la actividad simpática.....	67
Vagotomía .....	67
Perfusión intracardíaca .....	68
Infusión de oleato-C <sup>14</sup> .....	69
Diseción y extracción de tejidos.....	69
DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	69
Alteración del estado tiroideo.....	69
Tratamiento ICV crónico y agudo con T3 .....	70
Tratamiento ICV crónico con T3 en ratas vagotomizadas.....	70
Tratamiento ICV crónico con T3 y antagonista $\beta$ 3-AR (SR59230A) subcutáneo.....	71
Tratamiento IP crónico con T3 .....	72
Tratamiento núcleo-específico crónico de T3 mediante bombas.....	72
Tratamiento de T3 en regiones cercanas al VMH .....	73
Inoculación estereotáxica de Ad-TR-DN, Ad-AMPK-CA y Ad-AMPK-DN en el VMH .....	73
Inoculación estereotáxica de Ad-AMPK-CA en ratas hipertiroideas.....	74

Inoculación estereotáxica de Ad-AMPK-CA en ratas tratadas con T3 ICV .....	74
Tratamiento ICV de ceramidas en ratas hipertiroideas. ....	75
Inoculación estereotáxica de Ad-GRP78-DN en ratas hipertiroideas .....	76
Tratamiento ICV de Rottlerin (inhibidor de PKC) en ratas hipertiroideas.....	76
Tratamiento ICV de SP600125 (inhibidor de JNK) o de Rottlerin (inhibidor de PKC) en ratas tratadas con T3 ICV .....	77
Tratamiento ICV con T3 en ratones WT y JNK1KO.....	77
Inoculación de Ad-Cre en ratones JNK2KO- <i>jnk1 floxed</i> y posterior administración de T3 ICV. ....	78
TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	79
Extracción de proteína .....	79
Cuantificación de proteína.....	80
Western Blot .....	80
RT-PCR.....	85
Ensayos enzimáticos.....	90
Inmunohistoquímica .....	92
Inmunofluorescencia.....	92
Bioquímica.....	93
Análisis de lípidos .....	93
Lipidómica .....	94
Cuantificación de ceramidas .....	95
Tinción Oil-Red O.....	96
Estadística.....	96
RESULTADOS .....	97
Las ratas hipertiroideas muestran una marcada alteración en la ruta de la lipogénesis <i>de novo</i> en tejidos periféricos.....	99
La T3 a nivel central regula la ruta de la lipogénesis <i>de novo</i> en hígado y BAT.....	100
El PSNS media las acciones centrales de T3 en la lipogénesis <i>de novo</i> en el hígado.....	104
El SNS media las acciones centrales de T3 en la lipogénesis <i>de novo</i> en el BAT. ....	105

T3 a nivel central regula la captación de lípidos en BAT .....	107
T3 en el VMH regula la ruta de la lipogénesis <i>de novo</i> en hígado y BAT. ....	108
Los efectos centrales de la T3 en la lipogénesis <i>de novo</i> en hígado y BAT dependen de AMPK en el VMH.....	113
Las hormonas tiroideas alteran la composición lipídica en el hipotálamo de rata, reduciendo los niveles de ceramidas. ....	119
Las hormonas tiroideas reducen la lipotoxicidad hipotalámica inducida por ceramidas y el ER estrés. ....	121
Las ceramidas y la inducción de ER estrés revierten el efecto de la hormona tiroidea en la lipogénesis <i>de novo</i> y la termogénesis en BAT .....	124
La inhibición farmacológica de JNK revierte las acciones centrales de T3 en la lipogénesis <i>de novo</i> del hígado .....	128
JNK1 en el VMH media las acciones centrales de T3 en la lipogénesis <i>de novo</i> en el hígado. ....	132
DISCUSIÓN.....	139
Resumen gráfico.....	148
CONCLUSIONES .....	149
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	153
BIBLIOGRAFÍA.....	159



La obesidad y el sobrepeso se definen como un incremento de la masa corporal debido sobre todo a una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Ambos se han convertido en una epidemia mundial llegando a ser un problema importante de salud pública, convirtiéndose en el sexto factor principal de riesgo de defunción en el mundo (**Cuadro 1**). El aumento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad está asociado con muchas enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, accidentes cerebrovasculares, hipertensión y ciertos tipos de cáncer; esto conduce a una mayor tasa de mortalidad y morbilidad, reduciéndose así la calidad y la esperanza de vida de quién lo padece (Novelle et al., 2013; Medina-Gomez and Vidal-Puig, 2005; Fruhbeck, 2008; Calle and Kaaks, 2004; Farooqi, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica el estado nutricional de un individuo basándose en el Índice de Masa Corporal (*Body Mass Index*, BMI), una medida de asociación entre masa y la talla de un individuo (masa en kilogramos dividido por la altura en metros elevada al cuadrado) que es usada comúnmente para clasificar el bajo peso, sobrepeso y obesidad en adultos. Una persona con un IMC igual o superior a 25 es considerada con sobrepeso y con un IMC igual o superior a 30 es considerada obesa.

<b>Datos y cifras</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desde 1980, la prevalencia de la obesidad se ha duplicado en todo el mundo.</li> <li>• En 2008, 1400 millones de adultos (mayores de 20 años) presentaban sobrepeso. Dentro de este grupo, más de 200 millones de hombres y cerca de 300 millones de mujeres eran obesos.</li> <li>• En 2008, el 35% de las personas adultas mayores de 20 años presentaban sobrepeso, y el 11% eran obesas.</li> <li>• El 65% de la población mundial vive en países donde el sobrepeso y la obesidad se cobran más vidas de personas que la insuficiencia ponderal.</li> <li>• En 2012, más de 40 millones de niños menores de cinco años presentaban sobrepeso.</li> <li>• La obesidad puede prevenirse.</li> </ul>

**Cuadro 1-** Datos de la OMS sobre la obesidad y sobrepeso (*Nota descriptiva N°311 Mayo de 2014*).

El peso, la composición corporal y el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos en el tejido adiposo son determinados por la interacción entre factores genéticos, ambientales y sociales; todo esto afecta al balance energético, balance entre la ingesta de calorías y el gasto de las mismas. Estudios fisiológicos han sugerido previamente que la masa corporal y las reservas de energía son reguladas homeostáticamente, mediante la pérdida o ganancia de masa produciendo cambios en la ingesta o el gasto energético. Asumiendo que un individuo no tiene problemas con la absorción de nutrientes, el almacenamiento de energía en forma de grasa solo se incrementará si la energía ingerida excede el total del gasto energético



(actividad física, metabolismo basal y termogénesis adaptativa) (Spiegelman and Flier, 2001; Barsh et al., 2000; Schwartz et al., 2000; Schwartz and Porte, Jr., 2005).

Durante los últimos años muchas de las investigaciones se han centrado en identificar los mecanismos moleculares de la homeostasis energética (Fruhbeck, 2008; Medina-Gomez and Vidal-Puig, 2005; Medina-Gomez et al., 2005). El sistema nervioso central (CNS) influye en el balance energético y la masa corporal a través de tres mecanismos: (1) efecto del ambiente, incluyendo alimentación y actividad física; (2) efectos en la actividad del sistema nervioso autónomo, que regula el gasto energético y otros aspectos del metabolismo; y (3) efectos en el sistema neuroendocrino, incluyendo secreción de hormonas como hormona de crecimiento (GH), hormonas tiroideas (THs), insulina, cortisol y hormonas sexuales. La coordinación de este sistema complejo ha sido sujeto de intensos estudios y ha aportado muchos avances en el estudio de la obesidad (Spiegelman and Flier, 2001; Rossner, 2002).

La prevención debería ser el primer mecanismo de acción contra la obesidad, pero también es muy importante el desarrollo de estrategias para el tratamiento. Nuevas señales y factores involucrados en la modulación del balance energético y del metabolismo están siendo continuamente descubiertos, proporcionando nuevas dianas terapéuticas para fármacos potenciales contra la enfermedad metabólica. Una estrategia complementaria es el mejor conocimiento de cómo las señales hormonales actúan y como la manipulación de las rutas en las que están implicadas puede conducir a una mejora de la disfunción metabólica (Spiegelman and Flier, 2001; Lopez et al., 2013).

El potencial de las hormonas tiroideas en el tratamiento de la obesidad ha sido conocido desde hace décadas pero su uso terapéutico ha sido obstaculizado por sus efectos secundarios. Conocer sus mecanismos de acción e implicación en el balance energético puede ser de gran relevancia para el tratamiento de la obesidad o el síndrome metabólico.



### **HOMEOSTASIS ENERGÉTICA: las señales periféricas**

Es conocido que el hipotálamo regula el balance energético a través de una serie de procesos que implican la integración de hormonas periféricas, señales neuronales de saciedad y del estado nutricional y la propia detección de nutrientes. El hipotálamo no sólo regula la ingesta de comida y el gasto de energía, sino que también la utilización y participación de nutrientes, regulación de la homeostasis de la glucosa y el metabolismo periférico de los lípidos (Spiegelman and Flier, 2001; Williams, 2012).

Ciertas hormonas sintetizadas a nivel periférico son capaces de enviar información al cerebro e intervenir así en la homeostasis energética, el apetito y la saciedad; algunas de ellas, todas conocidas por reducir la ingesta, son: colecistoquinina (*cholecystokinin*, CKK), glucagon, péptido similar al glucagon tipo 1 (*Glucagon like peptide-1*, GLP-1), resistina, enterotastina, polipéptido pancreático, etc.(Singh, 2014); dentro de estas, existen dos importantes hormonas anorexigénicas que envían señales al hipotálamo del estado nutricional y de adiposidad conocidas con el nombre de leptina, producida por el tejido adiposo blanco, y la insulina producida por las células- $\beta$  del páncreas. La única hormona periférica orexigénica es conocida con el nombre de ghrelin y es producida principalmente en el estómago (Williams, 2012). Hablaremos a continuación un poco más extensamente de algunas de los más relevantes.

#### Leptina e insulina

- Leptina

Es una proteína conocida por su capacidad para suprimir el apetito y regular el gasto energético. Es sintetizada principalmente por los adipocitos (95% de la producción), aunque también se ha encontrado en el estómago y en la glándula pituitaria (Sobrino et al., 2014). Los niveles circulantes de leptina están correlacionados con el índice de masa corporal y el tejido adiposo. Su concentración en sangre va a ser proporcional al contenido de grasa así como en función del gasto energético (Considine et al., 1996; Schwartz et al., 1997; Schwartz et al., 2000). Los receptores de leptina (*leptin receptors*, LEPRs) son expresados en distintas regiones del cerebro incluyendo el ARC en el hipotálamo (Dodd et al., 2015). La leptina es transportada a través de la barrera hematoencefálica por un sistema de transporte saturable (Banks et al., 1996; Banks, 2001) y ejerce un efecto anorexigénico a través del arcuato (Mercer et al., 1996a), de tal forma que inhibe las neuronas NPY/AgRP y activa las neuronas POMC/CART, produciendo como resultado una reducción en la ingesta (Baskin et al., 1999; Sahu, 2003). Además la leptina estimula la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) incrementando el gasto energético mediante la estimulación del tejido adiposo pardo (*Brown Adipose Tissue*, BAT) y la expresión de UCP-1 (Boguszewski et al., 2010) (Sobrino et al., 2014; Dodd et al., 2015). Deficiencia en leptina causa obesidad severa con marcada hiperfagia (Coll et al., 2007).

- La insulina.

La insulina es una hormona producida por el páncreas, concretamente en los islotes de Langerhans en las células  $\beta$ -pancreáticas. Es la principal hormona que suministra glucosa a los tejidos proveniente de la sangre y su secreción va estar directamente relacionada con los niveles de glucosa en sangre (Woods et al., 2000) además de poder estar también vinculada, al igual que la leptina, con los niveles de adiposidad, es decir, a las reservas de grasa en el cuerpo (Polonsky et al., 1988; Schwartz et al., 2000; Woods et al., 2000) . La insulina viaja a través de la circulación actuando en el hipotálamo implicándose así en el control del masa corporal a través del sistema nervioso central (Schwartz et al., 2000; Sobrino et al., 2014). Las neuronas POMC y AgRP son dianas cruciales de la señalización por insulina (Varela and Horvath, 2012), poseen una elevada expresión de su receptor y ha sido demostrado que la administración central de insulina regula el comportamiento de la ingesta, suprimiéndola, ya que desciende la expresión de NPY y por el contrario estimula la expresión de POMC (Porte, Jr. et al., 2005).

#### Señales de saciedad: Ghrelin

Responden al contenido de nutrientes y sus niveles están influenciados por la cantidad de calorías que se incorporan en la dieta. Una de las más importantes:

La ghrelin es una hormona orexigénica recientemente descubierta, producida y sintetizada en el estómago que actúa como un ligando endógeno natural del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS, *Growth hormone secretagogue receptor* o *ghrelin receptor*) (Simpson et al., 2009; Iantorno et al., 2014). En menor proporción es secretada también por el tejido intestinal, el hígado, el páncreas endocrino, las gónadas, la placenta (donde no se conoce su función muy bien), la glándula pituitaria y el hipotálamo (Ravussin et al., 2001). La ghrelin estimula el apetito y sus niveles se incrementan con el ayuno y descienden después de comer, al contrario que otras hormonas (Tschop et al., 2001; Cummings et al., 2002; Iantorno et al., 2014). También existe esta hormona en el núcleo ARC del hipotálamo, y se ha encontrado neuronas inmunorreactivas para ghrelin en los núcleos paraventricular, arcuato, ventromedial y dorsomedial del hipotálamo, y en la región perifornical y el lecho ependimal del tercer ventrículo (Kojima et al., 1999; Cowley et al., 2003). La administración ICV de ghrelin causa un incremento dosis-dependiente en la ingesta y reduce el gasto energético provocando un aumento en el peso corporal (Dhillon and Bloom, 2001; Wren et al., 2001). El efecto de la ghrelin en el CNS podría estar mediado principalmente por la acción sobre el ARC, sobre las neuronas NPY/AgRP (Kamegai et al., 2001; Shintani et al., 2001; Casanueva and Dieguez,

2002; Kamegai et al., 2001). La infusión crónica de ghrelin en el CNS no solo incrementa la lipogénesis o inhibe la oxidación del tejido adiposo blanco sino que también provoca un descenso en la expresión de UCP1 y 3 en el BAT, produciendo una reducción del gasto energético (Kamegai et al., 2001; Coll et al., 2007; Coll and Yeo, 2013).

Los niveles de ghrelin en individuos obesos se ha visto que están disminuidos (Dhillon and Bloom, 2001; Tschop et al., 2001) y por el contrario en individuos que padecen anorexia nerviosa o algún tipo de reducción de dieta poseen altos niveles de esta hormona (Cummings et al., 2002; Sam et al., 2012).

### **EL HIPOTÁLAMO**

El hipotálamo es conocido como un elemento fundamental en el control y la coordinación de la actividad homeostática periférica. Esta pequeña región diencefálica localizada debajo del tálamo es considerada el centro neuroendocrino del organismo y controla un amplio número de procesos homeostáticos como son la ingesta, la saciedad, la bebida, el metabolismo, la temperatura la reproducción, la lactancia, la función cardiovascular, el ciclo sueño-vigilia y la secreción hormonal (Everitt and Hokfelt, 1990; Lopez et al., 2010a; Kalsbeek et al., 2010).

Esta región está organizada anatómicamente en poblaciones de células establecidas en grupos definidos llamados núcleos, con múltiples conexiones neuronales gracias a proyecciones axonales formando de esta forma circuitos. Estos núcleos hipotalámicos modifican la expresión de neurotransmisores específicos y neuromoduladores dependiendo de la señal homeostática proveniente de los nutrientes (aminoácidos, ácidos grasos y glucosa) y de hormonas (leptina, ghrelin, glucosa, resistina e insulina) que alcanzan el hipotálamo e informan de la condición de las reservas energéticas dentro del cuerpo (Dietrich and Horvath, 2013; Lage et al., 2008; Murphy and Ebling, 2011; Martinez de Morentin et al., 2014b; Lopez et al., 2007b; Lopez et al., 2007a). Esta información es procesada en poblaciones neuronales específicas capaces de modular la expresión o síntesis de neuropéptidos orexigénicos (promueven la ingesta de energía) o neuropéptidos anorexigénicos (inhiben la ingesta). Dentro de estos núcleos hipotalámicos los más relevantes modulando la homeostasis energética son: el núcleo arcuato (ARC), el paraventricular (PVH), el dorsomedial (DMH), el ventromedial (VMH) y el lateral (LHA).

### **El núcleo arcuato**

Uno de los núcleos más importantes en el control de la ingesta, es el núcleo arcuato (ARC). Está localizado por debajo del VMH a ambos lados del tercer ventrículo y próximo a la eminencia media donde la barrera hematoencefálica es semipermeable, haciendo de él un lugar perfecto para recibir señales periféricas inductoras de la saciedad o el apetito como son la leptina, ghrelin, insulina, glucocorticoides y hormonas tiroideas, reflejando la disponibilidad de nutrientes (Herwig et al., 2008; Simpson et al., 2009). Lesiones en el ARC de ratones resulta en obesidad e hiperfagia (Olney, 1969).

El núcleo arcuato está formado por dos importantes y diferenciadas poblaciones neuronales con efectos opuestos en la ingesta de energía: I) un grupo de neuronas anorexigénicas, las neuronas POMC, que expresan pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (*cocaine and amphetamine regulated transcript*, CART), todos proyectan ampliamente en el CNS, y II) otro grupo de neuronas orexigénicas, las neuronas AgRP que co-expresan el péptido relacionado con agouti (*agouti related protein*, AgRP) y el neuropéptido Y (NPY); estas neuronas proyectan sus axones a otros grupos de neuronas localizadas en el núcleo paraventricular (PVH) y en el área lateral hipotalámica (LHA), el núcleo dorsomedial (DMH) y el VMH (Morton et al., 2006). La mayoría de las neuronas del arcuato expresan el receptor de la leptina (Tartaglia et al., 1995; Mercer et al., 1996b) y de insulina (Marks et al., 1990), ambas hormonas inhiben las neuronas NPY/AgRP (Schwartz et al., 1992; Wang et al., 1997), que sin embargo son estimuladas por ghrelin (Kojima et al., 1999; Kamegai et al., 2001). Por el contrario, neuronas POMC/CART son activadas por leptina e insulina (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998; Elias et al., 1999) e inhibidas por ghrelin (Shintani et al., 2001). En general, cuando existe restricción calórica, o déficit energético, la concentración de leptina desciende, y como consecuencia en el hipotálamo hay un incremento en la expresión de genes orexigénicos (NPY, AgRP) y un descenso en la expresión de genes anorexigénicos (POMC, CART, THR) (Murphy and Ebling, 2011). La interacción entre estas dos poblaciones neuronales constituye el sistema de melanocortinas que es responsable del control del apetito y del gasto energético.

- **Neuronas NPY/AgRP**

NPY fue descubierto inicialmente por Tatemoto y colaboradores como un poderoso estimulador de la ingesta regulando la masa corporal a través de sus efectos en la ingesta y en el gasto energético (Tatemoto et al., 1982; Clark et al., 1984). Se expresa en todo el sistema nervioso central pero la mayoría de neuronas que expresan NPY se encuentran en el ARC y la mayoría coexpresan AgRP (Gehlert et al., 1987). NPY actúa a través de 5 tipos de receptores

(Y1-Y5) aunque sus acciones orexigénicas son ejercidas principalmente a través del Y1 y el Y5 (Nguyen et al., 2012). Su expresión se ve incrementada en condiciones de ayuno y reducida en condiciones de saciedad. Se ha observado que en ratas adultas, la inyección ICV de NPY estimula la ingesta (Clark et al., 1984), provoca una reducción de la termogénesis en el BAT (Egawa et al., 1991) (Shi et al., 2013) y una inhibición del eje tiroideo (Fekete et al., 2001; Fekete et al., 2002). Sin embargo, a pesar de su claro efecto orexigénico, la ablación del gen *npy* en estados embrionarios no produce efectos sobre la ingesta ni el gasto energético (Erickson et al., 1996; Luquet et al., 2005; Shi et al., 2013) y la inactivación genética de NPY durante el estado adulto da lugar a un fenotipo delgado e hipofágico leve (Marsh et al., 1999; Thorsell and Heilig, 2002; Ste et al., 2005). Esto lleva a pensar que debe existir otro mecanismo compensatorio generado por otros neuropéptidos.

AgRP es otro neuropéptido orexigénico. Fue descubierto como un agonista inverso de los receptores de melanocortinas. La co-localización de estos dos péptidos fue descubierta poco después y se vio que tanto NPY como AgRP estaban presentes en los mismos procesos derivados de las neuronas asociadas al hambre. Estas neuronas además liberan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA: neurotransmisor del CNS cuyo papel principal es la reducción de la excitabilidad) estableciendo una acción inhibitoria de las neuronas de NPY/AgRP. La administración central de AgRP o bien su sobreexpresión genética se ha observado que induce un aumento de la ingesta y una disminución del gasto energético, generando así un fenotipo obeso (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997).

Estas neuronas tienen extensas proyecciones dentro del hipotálamo incluyendo el PVH, DMH y el LHA que parecen ser la principal diana de los efectos orexigénicos de NPY (Simpson et al., 2009).

- Neuronas CART/POMC

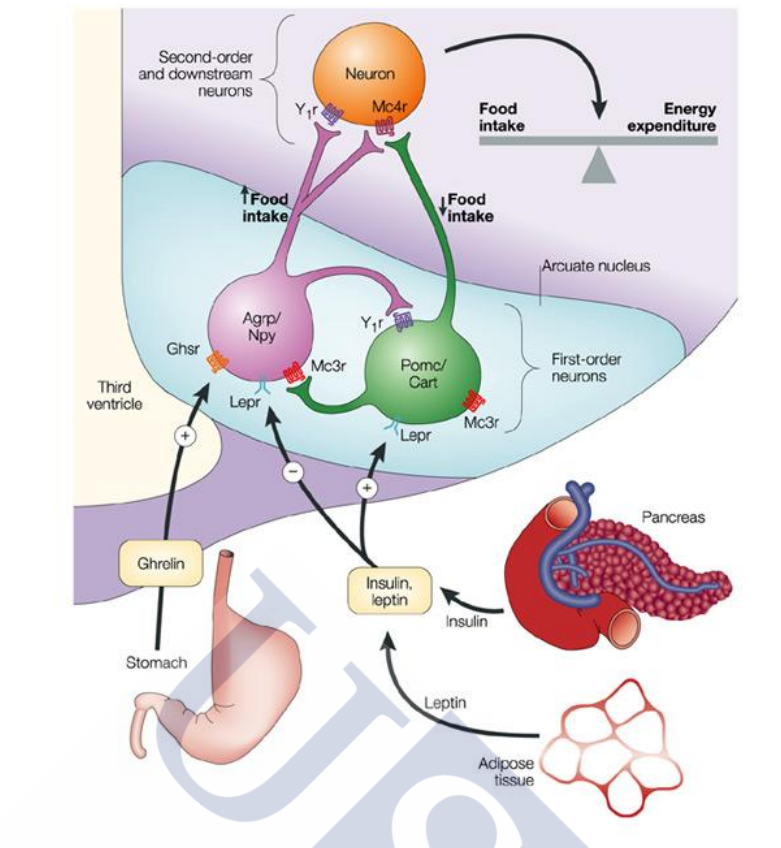
Las neuronas de POMC se caracterizan por sus acciones anorexigénicas y están entremezcladas con las neuronas NPY/AgRP. Estas neuronas son una mezcla de neuronas con naturaleza excitatoria e inhibitoria y liberadoras de neurotransmisores como glutamato y GABA (Hentges et al., 2009). Estas neuronas co-expresan POMC y CART. POMC actúa como péptido precursor de tal forma que tras su escisión, por enzimas convertasas, produce la hormona estimulante de melanocitos ( *$\alpha$ -melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH*) que ejerce sus efectos a través de la unión a receptores de melanocortinas (*melanocortin receptors, MC-Rs*) acoplados a proteínas G. Existen cinco tipos de MC-Rs aunque solo el MC3-R y el MC4-R se expresan en el cerebro, siendo este último el más expresado en el hipotálamo, sobretodo en el PVH (Elias et

al., 1999). POMC también actúa como precursor de la adrenocorticotropina (ACTH) y de la  $\beta$ -endorfina.

Las melanocortinas, incluida  $\alpha$ -MSH, liberadas desde las neuronas POMC del ARC se unen a receptores MC4-R para inhibir la ingesta. La delección de MC4-R en ratón resulta en hiperfagia, reducción del gasto energético y obesidad, resaltando la importancia de este receptor en la regulación del apetito (Huszar et al., 1997; Simpson et al., 2009). Estudios recientes han demostrado la importancia del sistema de melanocortinas en la regulación de la homeostasis energética en humanos; así mutaciones en MC4R provocan el 6% de la obesidad severa temprana en humanos y más de 90 mutaciones han sido asociadas con la obesidad (Vaisse et al., 1998; Farooqi et al., 2003; Simpson et al., 2009). La estimulación de las neuronas POMC en el ARC tiene como resultado una reducción de la ingesta (Aponte et al., 2011) mientras que su ablación genera fenotipos hiperfágicos y obesos (Yaswen et al., 1999; Challis et al., 2004; Zhan et al., 2013).

La mayoría de neuronas POMC en el ARC también co-expresan mRNA de CART. Estudios en animales han mostrado que la administración ICV de CART inhibe la ingesta de comida mientras que la inyección ICV de antisuero de CART incrementa la ingesta (Kristensen et al., 1998; Thim et al., 1998; Lambert et al., 1998), sugiriendo así un importante papel en la regulación de la ingesta y de la homeostasis energética. Los niveles de este neuropéptido en el ARC son regulados por la leptina circulante (Kristensen et al., 1998; Schwartz et al., 2000) siendo incrementado tras la administración de leptina periférica (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998; Wang et al., 2000) indicando su papel en la regulación del balance energético. Además, recientes estudios involucran activamente a este neuropéptido en el ciclo de sueño (Lee et al., 2014a) (**Ilustración 1**).





**Ilustración 1.** Representación de los dos grupos neuronales en el ARC (AgRP/NPY y Pomc/Cart) regulados por los niveles de hormonas circulatorias. Insulina y leptina inhiben las neuronas AgRP/NPY, mientras que estimulan las neuronas POMC/CART. Ghrelin activa las neuronas AgRP/NPY estimulando la ingesta. (Barsh and Schwartz, 2002).

### El núcleo ventromedial del hipotálamo

El núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) es un núcleo altamente conservado en todas las especies, formado por un grupo de células bilaterales que se sitúan cerca de la base del diencefalo, adyacentes al tercer ventrículo lateralmente al ARC. En la década de los 40, surgieron las primeras evidencias de que el VMH podría estar involucrado en la regulación de la ingesta y del metabolismo energético mediante estudios realizados con animales que presentaban lesiones en esta región ya que desarrollaban rápidamente un fenotipo obeso (Hetherington and Ranson, 1940, 1942). Además se ha implicado en un gran número de funciones homeostáticas y comportamentales tales como la regulación del comportamiento sexual femenino, alimentación, balance energético y función cardiovascular (McClellan et al., 2006; Shimogawa et al., 2014).

Estudios con *microarrays* muestran que existen genes marcadores específicos del VMH como el factor esteroideogénico 1 (*steroidogenic factor-1*, SF-1) (Segal et al., 2005), un factor de transcripción implicado en el desarrollo de las funciones fisiológicas del VMH. Su expresión está restringida a neuronas de este área (sobre todo la zona central y ventromedial) y está implicado en su correcto desarrollo (Budefeld et al., 2012) además de ser un componente esencial en el balance energético (King, 2006) (Jo, 2012). Las neuronas que expresan SF-1 están implicadas en la homeostasis energética (Zhang et al., 2008) y contribuyen en la detección de importantes reguladores energéticos como por ejemplo la leptina (Dhillon et al., 2006). Ratones *knockout* en SF-1, carentes de un VMH normal, llegan a ser obesos y pueden alcanzar el doble de su masa normal (Majdic et al., 2002); esto se atribuye principalmente a un descenso en la actividad (King, 2006) y en su capacidad termogénica (Kim et al., 2011).

Existe también otro factor llamado factor neurotrófico derivado del cerebro (*Brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) que es altamente expresado en el VMH e implicado en la regulación de la ingesta y la masa corporal en roedores y humanos (Lyons et al., 1999; Rios et al., 2001; Xu et al., 2003; Jo, 2012). Su expresión en el VMH está regulada por nutrientes y señales asociadas a ellos, como son la glucosa, la leptina (que aumenta sus niveles de expresión) (Komori et al., 2006) y el ayuno (produce su reducción en el VMH) (Rios et al., 2001). Algunas neuronas SF-1 expresan este factor de tal forma que SF-1 modula su expresión (Jo, 2012). Se piensa que las neuronas POMC del ARC tienen un papel en la activación de las neuronas del BDNF para que ocurra ese descenso en la ingesta y de la masa corporal (Simpson et al., 2009; Pellemounter et al., 1995; King, 2006).

El VMH tiene numerosas conexiones neuronales con otras áreas del cerebro implicadas en el comportamiento alimenticio. Estudios previos han demostrado que las conexiones neuronales entre el VMH y diferentes regiones del cerebro como son el área preóptica medial (POA), la estría terminal (la mayor vía eferente de la amígdala terminal), la amígdala (AMG) (implicada en aspectos emocionales del comportamiento alimenticio), el núcleo anterior (AH), la sustancia gris central del mesencéfalo (*Midbrain Central Gray*, MCG) y la eminencia media son importantes para las funciones neuroendocrinas en roedores (Renaud and Martin, 1975; Millhouse, 1978; Shimogawa et al., 2014; Noble et al., 2014). A su vez, el VMH recibe numerosas proyecciones neuronales de NPY, AgRP y POMC desde el ARC (Palkovits, 2003; Simpson et al., 2009) y en él se expresan los receptores de NPY Y1 y Y5 así como MC4-R (Lopez-Valpuesta et al., 1996; Harrold et al., 1999; Li and Davidowa, 2004). Posee una amplia población de neuronas sensibles a la glucosa que responden a la hipoglucemia además de numerosos receptores que responden a dopamina, serotonina, GABA, histamina y estrógenos (Shimogawa et al., 2014). Un gran número de receptores de la leptina también se expresan en este núcleo (Elmqvist et al., 1998).

En los últimos años, el núcleo ventromedial (VMH) comenzó a ser considerado como el principal núcleo encargado del control del gasto energético mediante la modulación de la termogénesis en el BAT (Morton et al., 2006; Xue and Kahn, 2006). Primero, se demostró que la estimulación eléctrica de este núcleo incrementaba la temperatura escapular del BAT y que este efecto se inhibía al bloquear los receptores beta-adrenérgicos (Perkins et al., 1981). Luego se postuló que este núcleo formaba parte de un eje entre VMH-Sistema Nervioso simpático (SNS)-BAT a través del cual se modula la termogénesis en el BAT (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2012a; Martinez de Morentin et al., 2014a). Lo desarrollaremos más adelante.

### **El núcleo paraventricular**

El núcleo paraventricular (PVH) está localizado en el hipotálamo anterior encima del tercer ventrículo y ocupa una posición central en la regulación de la ingesta y el gasto energético. Recibe un gran número de señales entrantes desde otras regiones hipotalámicas, también del tronco cerebral, así como señales peptídicas y parámetros fisiológicos conocidos por su acción en la modulación de la ingesta. Por ejemplo las neuronas sensibles a leptina presentes en el ARC proyectan sus axones a este núcleo (Cowley et al., 1999a; Sutton et al., 2014). La ruta de las melanocortinas está muy estrechamente ligada a la función de este núcleo y en él existe una densa expresión de receptores de melanocortinas (Kishi et al., 2003; Sutton et al., 2014). Las fibras de NPY/AgRP y  $\alpha$ -MSH convergen en este núcleo también (Cowley et al., 1999b; Li et al., 2000). Lesiones en el PVH son seguidas de un incremento en la ingesta y obesidad (Aravich and Sclafani, 1983; Tokunaga et al., 1986). Además de su vinculación con la regulación de la ingesta también existen datos que apoyan su participación en el control del gasto energético, de tal forma que la infusión en el PVH de un agonista de uno de los receptores de melanocortinas produce un incremento en el gasto energético (Cowley et al., 1999a; Sutton et al., 2014).

Una gran variedad de neuropéptidos son sintetizados en este núcleo, algunos de ellos muy vinculados a la regulación de la ingesta. En el PVH se encuentran las neuronas liberadoras de la hormona liberadora de corticotropinas (*Corticotropin-releasing hormone*, CRH), implicadas en la regulación de la ingesta y del balance energético, reguladas conjuntamente por NPY y las melanocortinas, de tal forma que CRH desciende la ingesta e incrementa la actividad del sistema nervioso central a través de fibras que viajan desde el PVH a la médula espinal (Cowley et al., 1999a; Palkovits, 2003). La leptina estimula la expresión de RNA mensajero de CRH (Kalra et al., 1999; Sahu et al., 1995; Palkovits, 2003). Se ha observado en ratas obesas que la

administración central de CRH tiene un efecto inhibitorio sobre la ingesta (Rohner-Jeanrenaud et al., 1989).

Por otra parte, la hormona liberadora de tirotropina (*Thyrotropin-releasing hormone*, TRH) es sintetizada en las neuronas parvicelulares del PVH y algunas de estas células coexpresan también el péptido CART. Estas neuronas reciben inervaciones de otras neuronas como AgRP y POMC del ARC (Fekete et al., 2001; Ghamari-Langroudi et al., 2010). La TRH suprime la ingesta y juega un papel crucial en la regulación del balance energético (Kow and Pfaff, 1991). La TRH estimula la liberación de tirotropina u hormona estimulante de la tiroides (TSH) por parte de la hipófisis. Veremos esto más adelante.

Por último, en neuronas locales del PVH es sintetizada la galanina, un marcador neuroquímico de la ingesta de grasa que contribuye al apetito natural por las grasas y es inhibido por la insulina (Akabayashi et al., 1994; Sahu et al., 1995; Wang and Leibowitz, 1997; Palkovits, 2003).

### **El núcleo dorsomedial**

El núcleo dorsomedial (DMH) está formado por tres subdivisiones y está implicado en un amplio número de procesos fisiológicos tales como apetito, termorregulación o estrés (Schneeberger et al., 2014). Aunque este núcleo contienen receptores de leptina e insulina (Marks et al., 1990; Mercer et al., 1996b) así como terminaciones axonales de neuronas NPY/AgRP del ARC (Schwartz et al., 2000), solo unos pocos péptidos orexigénicos y anorexigénicos son expresados en este núcleo (Palkovits, 2003). Las neuronas que expresan el péptido similar a la galanina (*Galanin galanin-like peptide*, GALP) están presentes en la región más caudal de este núcleo (Jureus et al., 2000; Palkovits, 2003).

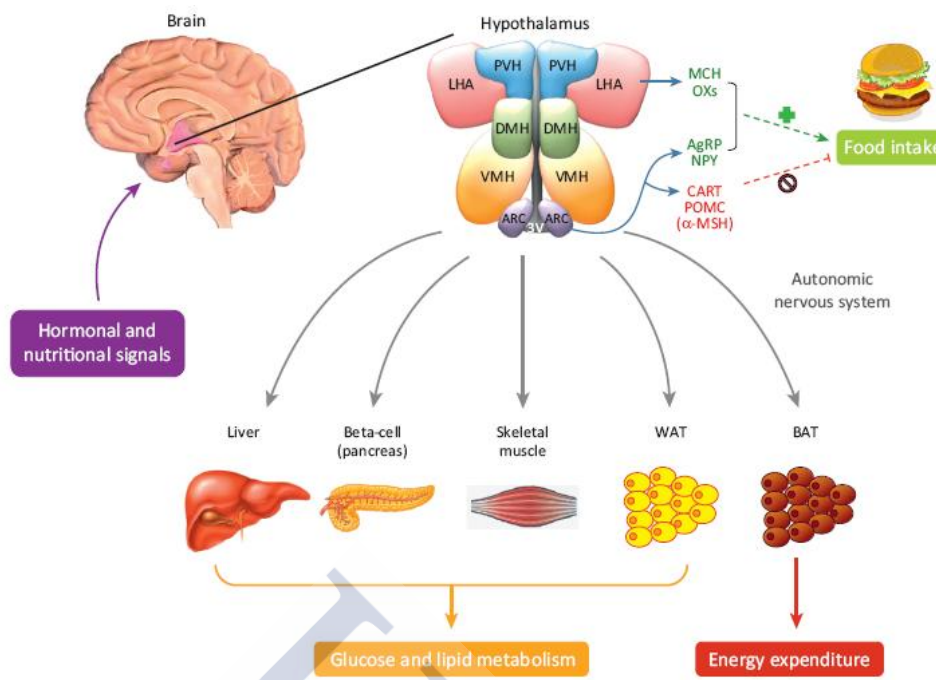
Lesiones en el DMH inhiben la ingesta (Bernardis and Bellinger, 1987). Este papel en el comportamiento de la ingesta puede estar relacionado con el hecho de que las neuronas de este núcleo emiten sus proyecciones al VMH y PVH (Thompson et al., 1996) y son activadas por leptina (Elmqvist et al., 1998). Como ocurre en otras regiones hipotalámicas, la microinyección de varias de las señales orexigénicas en el DMH provocan un incremento en la ingesta (Kalra et al., 1999). El aumento de los niveles de NPY en este núcleo por manipulación farmacológica o genética estimula la ingesta y el aumento de la masa corporal (Yang et al., 2009b; Bi et al., 2012).

### **El área hipotalámica lateral**

El área lateral hipotalámica (LHA) ha sido considerada esencial en la regulación de la ingesta y de la masa corporal. Lesiones en esta área resultan en una ingesta deficiente e incluso a veces en afagia (ausencia de ingesta) (ANAND and BROBECK, 1951; Palkovits, 2003). Recibe e integra muchas señales incluyendo estímulos metabólicos para modular la ingesta, la actividad y la atención o alerta según las condiciones ambientales y nutricionales (MORRISON et al., 1958; Goforth et al., 2014). Para contribuir a este proceso, el LHA recibe numerosas proyecciones desde el ARC y dos tipos de neuropéptidos orexigénicos han sido localizados en su superficie: MCH y OXs. Terminales inmunorreactivas de NPY, AgRP y  $\alpha$ -MSH están presentes en este núcleo y mantienen contacto con células que expresan MCH y OXs (Broberger et al., 1998; Goforth et al., 2014). Se ha demostrado que lesiones en esta región conducen a marcadas alteraciones metabólicas y endocrinas, tales como problemas de crecimiento, problemas en el eje tiroideo y en la homeostasis de la glucosa (Bernardis et al., 1992; Lopez et al., 2010a).

En humanos se han identificado dos receptores de MCH, Mchr1 y Mchr2, mientras en roedores solo ha sido identificado el primero de ellos, Mchr1. Ratones *knockout* para Mchr1 presentan un incremento en el gasto energético, actividad locomotora y son resistentes a la obesidad inducida por dieta (Chen et al., 2002; Simpson et al., 2009), mientras que la inyección en ratas en este núcleo de MCH provoca un incremento en la ingesta de alimento (Qu et al., 1996; Chen et al., 2002; Imbernon et al., 2013) y su sobreexpresión en ratones conduce a obesidad y resistencia a insulina (Chen et al., 2002).

Otro neuropéptido expresado en el LHA es la orexina, también llamada hipocretina. Existen dos tipos que derivan del mismo precursor: orexina A y orexina B, y actúan a través de dos receptores OX1R y OX2R. Su administración ICV incrementa la ingesta (Sakurai et al., 1998; Lopez et al., 2010a; Alvarez-Crespo et al., 2013) y la leptina representa un modulador crucial de este neuropéptido, inhibiendo la activación de sus neuronas (Lopez et al., 2000; Yamanaka et al., 2010; Goforth et al., 2014). Sin embargo, se vio también el importante papel de este neuropéptido en los ciclos de sueño de tal forma que su ausencia en modelos animales o bien en humanos provoca narcolepsia; por lo tanto se ha postulado que sus efectos en la ingesta, nada claros aun, están ligados a la excitación y sueño reducido asociados (Hagan et al., 1999; Hara et al., 2001; Simpson et al., 2009).



**Ilustración 2.** Regulación hipotalámica del balance energético. (Lopez et al., 2013)

### METABOLISMO LIPÍDICO

El tejido adiposo blanco ('white adipose tissue', WAT) almacena triacilglicéridos durante períodos de exceso de energía y los hidroliza (lipólisis) para la obtención de ácidos grasos que serán usados por otros tejidos durante períodos de déficit energético. Este tejido representa el órgano más eficiente para almacenar el exceso de ácidos grasos circulantes durante el periodo postprandial (Zimmermann et al., 2009). Mientras la síntesis de triacilglicéridos ocurre también en otros órganos como por ejemplo el hígado (producción de VLDL: lipoproteína de muy baja densidad), la lipólisis para la provisión de ácidos grasos para otros órganos parece ser exclusivo de los adipocitos (Ahmadian et al., 2009). En períodos de demanda, los ácidos grasos son liberados desde la célula (donde se encuentran almacenados en forma de gotas de grasa) por la acción de lipasas. Inicialmente, la limitada cantidad de lípidos presentes en los tejidos va a ser hidrolizada. Pero durante periodos de ayuno prolongado, estos almacenes son insuficientes para los requerimientos de ácidos grasos para la producción de energía y las reservas de grasa son movilizadas mediante la inducción de la lipólisis en los adipocitos.

Fisiológicamente, los triglicéridos representan el mayor almacenamiento de energía del cuerpo. El hígado es uno de los órganos centrales en el metabolismo de los ácidos grasos y de los triglicéridos ya que recibe ácidos grasos de dos fuentes: la primera fuente proviene de la hidrólisis de los triglicéridos derivados del intestino que viajan en los quilomicrones durante el

período postprandial, y la otra fuente proviene de los ácidos grasos no esterificados (*non-esterified fatty acids*, NEFA) derivados de la lipólisis del tejido adiposo durante las condiciones de ayuno. Junto a estas dos fuentes exógenas de lípidos el hígado es también capaz de sintetizar ácidos grasos (lipogénesis *de novo*) a partir del exceso de glucosa. Estos ácidos grasos provenientes de diferentes fuentes pueden ser utilizados para la oxidación en el hígado, o bien ser ensamblados en triglicéridos para el almacenamiento o la secreción desde el hígado al plasma en su mayoría en partículas conocidas como lipoproteínas, principalmente en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (*very low-density lipoproteins*, VLDL) (VLDL-TG) (Gibbons et al., 2000; Bruinstroop et al., 2014). La regulación de las VLDL-TG y su secreción es muy compleja; la disponibilidad de ácidos grasos, las hormonas (como la insulina) y la formación o degradación de ApoB (la mayor proteína estructural de VLDL) han sido implicadas en la regulación de la secreción de estas partículas (Gibbons, 1990; Mason, 1998). Las VLDL-TG secretadas por el hígado pueden ser almacenadas en el tejido adiposo o ser usadas como fuente de energía predominantemente por los músculos (Bruinstroop et al., 2014). Tanto factores hormonales como el sistema nervioso autónomo pueden regular el metabolismo lipídico hepático (Bruinstroop et al., 2014). Dentro del hígado es muy importante la lipina 1 (LIPIN1) ya que controla la producción de TAG y la secreción de VLDL, así como los procesos de regeneración. Esta enzima existe en muchos otros tejidos: participa en el desarrollo y mantenimiento del tejido adiposo, en el músculo controla el gasto energético y los procesos de autofagia, y en el sistema nervioso periférico controla los procesos de mielinización (Csaki and Reue, 2010). Su importancia es clave en el organismo ya que ratones deficientes en ella poseen dificultades en el metabolismo de los lípidos en el hígado y en el tejido adiposo así como resistencia a insulina (Mlinar et al., 2008; Peterfy et al., 2001). Deficiencias en esta proteína dan lugar a la patología conocida como lipodistrofia (Miranda et al., 2007). Los niveles de esta proteína pueden ser regulados por glucocorticoides, esteroides, ayuno, etc.

El paso limitante de la lipólisis está controlado por la lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta enzima cataliza la hidrólisis de triglicéridos hasta monoglicéridos, finalmente, éstos son degradados por la monoacilglicerol lipasa (*monoacylglycerol lipase*, MAGL). La HSL está sujeta a una intensa regulación; esta enzima se activa por fosforilación controlada por la proteína quinasa A (PKA), la cual está asimismo activada por la vía del AMP cíclico (AMPC). La lipólisis se verá estimulada por todas aquellas hormonas que al unirse a su receptor provoquen la activación de proteínas G estimulantes y, por tanto la estimulación de la adenilatoclasa y la formación de AMPC (catecolaminas unidos a receptores  $\beta_3$  adrenérgicos o glucagón). Por el contrario, la lipólisis va a ser inhibida por aquellas hormonas cuyo receptor se encuentra asociado a la adenilato ciclase a través de proteínas G inhibitorias (catecolaminas unidas a receptores  $\beta_2$  adrenérgicos o insulina).

Los ácidos grasos incorporados a las células deben entrar en la mitocondria para su  $\beta$ -oxidación. Este proceso va a estar controlado a nivel de la carnitin palmitoil transferasa I (*'carnitine palmitoyltransferase I'*, CPT1) un enzima mitocondrial que media el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana uniéndolos a las carnitina y regulada por los niveles plasmáticos de malonil-CoA (sustrato de la síntesis de ácidos grasos y regulador de su oxidación) (Lage et al., 2008; Wakil and Abu-Elheiga, 2009). La estearoil CoA desaturasa (*'Stearoyl-Coenzyme A desaturase-1'*; SCD1) representa uno de los pasos claves en el mantenimiento de los lípidos intracelulares pues está implicada en la regulación de la síntesis, oxidación y almacenamiento de ácidos grasos. Es una desaturasa que convierte los ácidos grasos saturados en ácidos grasos moninsaturados. Estos ácidos grasos monoinsaturados son los sustratos para formar triglicéridos, ésteres de colesterol y diacilglicéridos (Flowers and Ntambi, 2009). Los ácidos grasos extracelulares también pueden entrar en la célula para ser esterificados en el retículo endoplasmático a través de una vía en la que participa la enzima diacilglicerol aciltransferasa (*diacylglycerol acyltransferase*, DGAT) generando también TG a partir de acetyl CoA y diacilglicerol (DG) que pueden ser posteriormente secretados. Existen dos isoformas, DGAT1 y DGAT2, ambas se encuentran principalmente en el ER y se expresan ampliamente en numerosos tejidos pero sobre todo en aquellos con gran producción de TG como el WAT y el hígado (Yen et al., 2008). DGAT2 parece poseer más afinidad por los sustratos y su ausencia en ratones *knock out* no es compatible con la vida (Stone et al., 2004).

Los lípidos de la dieta (principalmente triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol), una vez que llegan al intestino delgado son emulsionados por las sales biliares y las enzimas pancreáticas los transforman en productos primarios (monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol, fragmentos de fosfolípidos, etc.). Estos productos primarios son usados por los enterocitos para formar quilomicrones que salen vía linfática hacia la sangre. Estos quilomicrones y las VLDL son la principal fuente de triglicéridos para los adipocitos; estos son hidrolizados hasta ácidos grasos libres y monoglicerol por la lipoproteína lipasa (LPL) (Wang and Eckel, 2009). Esta enzima se expresa en numerosos tejidos como el músculo esquelético, tejido adiposo blanco y marrón (BAT) y en menor medida en tejidos como el hígado y el pulmón; su actividad es útil para determinar los niveles de triacilglicéridos en el adipocito (Fried et al., 1993) y en su regulación interviene el estado nutricional y hormonal. (Wang and Eckel, 2009). Los ácidos grasos libres hidrolizados son captados por los adipocitos a través de procesos de transporte activo mediado por proteínas transportadoras específicas de ácidos grasos, como la proteína de unión a ácidos grasos 3 (*'fatty acid-binding proteins'*, FABP3). Estas proteínas están relacionadas con el transporte intracelular de ácidos grasos, con la captación celular de ácidos grasos (liberados por la albúmina), su almacenamiento intracelular, y con la entrega de los ácidos grasos a los sitios de su utilización. A mayores modulan la concentración intracelular de ácidos grasos y por lo tanto intervienen en la regulación del



metabolismo lipídico (Chmurzynska, 2006). Una vez en el interior de la célula, los ácidos grasos libres son re-esterificados para formar triglicéridos.

Algunos factores de transcripción que intervienen en el metabolismo lipídico son PGC1 $\alpha$  y PGC1 $\beta$  (receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa y beta). Estos son coactivadores transcripcionales que mejoran la actividad de muchos receptores nucleares y coordinan los programas de transcripción importantes para el metabolismo energético (incluidas la biogénesis y oxidación mitocondriales) y la homeostasis energética. PGC1 $\alpha$  se expresa selectivamente en tejidos con sistemas mitocondriales muy desarrollados como el corazón, músculo esquelético, grasa parda e hígado, donde regula respectivamente algunos tipos de fibras oxidativas, la contracción, termogénesis, gluconeogénesis y  $\beta$ -oxidación (Alaynick, 2008). Este factor de transcripción coactiva por un lado a PPAR $\gamma$  (*peroxisome-proliferator activated receptors*), receptor nuclear altamente expresado en grasa considerado como el ‘director regulador’ de la adipogénesis y sin él las células precursoras son incapaces de expresar cualquier aspecto fenotípico de los adipocitos (Farmer, 2006). Por otro lado, también activa al factor respiratorio nuclear 1 (*nuclear respiratory factor 1*, NRF1) que parece estar implicado en la expresión de distintas subunidades nucleares respiratorias, así como en la expresión de elementos que componen la maquinaria de replicación y transcripción; juega un papel importante en la biogénesis mitocondrial y el estrés oxidativo (Chen et al., 2003).

Como mencionamos antes, los ácidos grasos pueden derivar de la dieta o de la síntesis *de novo*. La lipogénesis *de novo*, es el proceso por el cual el exceso de glucosa es incorporado por el hígado o el tejido adiposo y mediante una serie de reacciones se convierte en ácidos grasos que posteriormente serán esterificados a glicerol para formar los triacilglicéridos. La ruta de biosíntesis *de novo* de los ácidos grasos comprende tres enzimas principales; la acetil-CoA carboxilasa (*acetyl-CoA carboxylase*, ACC) que cataliza la síntesis de malonil-CoA (donador de carbonos en la síntesis *de novo*); la ácido graso sintasa (*fatty acid synthase*, FAS) es un complejo enzimático que convierte posteriormente ese malonil-CoA en ácidos grasos de cadena larga, como el palmitato; y la malonil-CoA decarboxilasa (MCD) incrementa la descarboxilación del malonil-CoA, reduciendo los niveles de malonil-CoA celular y generando acetil-CoA (Lopez et al., 2007a) (Menendez et al., 2009). ACC cataliza la carboxilación de acetil-CoA hacia malonil-CoA en un proceso dependiente de ATP; esta síntesis de malonil-CoA es regulado reversiblemente por la MCD que convierte otra vez el malonil hacia acetil-CoA. Ambos, son usados como substratos para la producción de palmitato, el principal producto de FAS. El resultado final es una molécula de ácido graso saturada producida por FAS que puede ser metabolizado dependiendo de los requerimientos: por un lado puede ser desaturado para la formación de ácidos grasos insaturados, derivado a moléculas de triglicéridos para el

almacenamiento o canalizados hacia una serie de fosfolípidos con funciones celulares (Dowell et al., 2005).

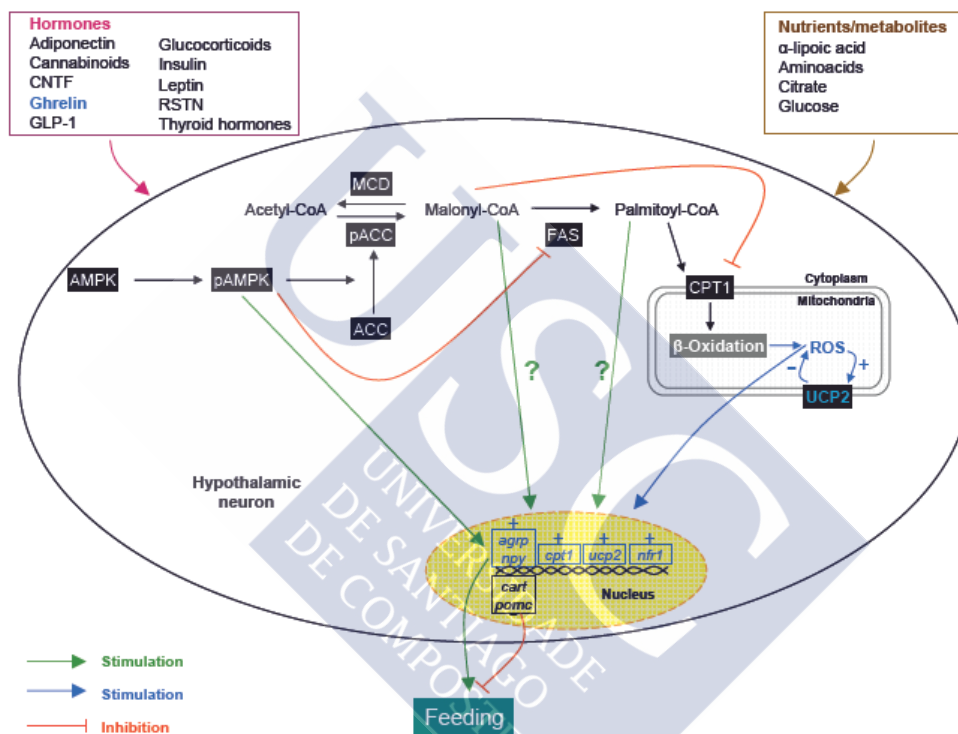
El malonil-CoA no es solo un producto intermedio en la biosíntesis de los ácidos grasos, sino que también es un importante regulador de la balanza entre la lipogénesis *de novo* y la oxidación de los ácidos grasos. Los niveles de malonil-CoA dependen del equilibrio entre la actividad de las enzimas ACC, FAS y MCD. La actividad de ACC y MCD están reguladas por la fosforilación a través de la AMP proteína kinasa (AMPK). Cuando esta es activada (fosforilada), fosforila e inhibe ACC, mientras que activa MCD. A mayores, AMPK una vez activado también disminuye los niveles de expresión de FAS a través de un mecanismo dependiente de una proteína llamada, proteína de unión al elemento regulador de esteroides (*sterol regulatory element binding protein-1*, SREBP-1). Por lo tanto el efecto global de la activación de AMPK es la reducción de malonil-CoA y el flujo de sustratos en la vía de la biosíntesis de ácidos grasos. La disminución de los niveles de malonil-CoA estimula a CPT1, enzima que se encarga de la importación de los ácidos grasos de cadena larga hacia las mitocondrias para su oxidación (Lopez et al., 2007a; Lage et al., 2008).

Alterando el flujo a través de la ruta, los niveles de malonil-CoA pueden ser regulados para activar o inhibir la  $\beta$ -oxidación en las mitocondrias (Ruderman et al., 2003; Lopez et al., 2007a). El significado metabólico de los niveles de malonil-CoA se enfatiza gracias a que hay dos isoformas de ACC (ACC1 y ACC2), ambas catalizan la formación de malonil Co-A; ACC1 se expresa principalmente en los tejidos lipogénicos como el hígado y el tejido adiposo, donde se lleva a cabo el primer paso para la biosíntesis de ácidos grasos. Ciertos tejidos, como el músculo esquelético y el corazón, no llevan a cabo una cantidad significativa de síntesis de ácidos grasos debido a los bajos niveles de FAS que poseen. En estos tejidos, ACC2 sintetiza malonil-CoA para modulación de la actividad CPT1 en lugar de hacerlo con los fines biosintéticos (Saha et al., 1995; Ruderman et al., 2003).

#### Metabolismo de los ácidos grasos en el hipotálamo

Los enzimas implicados en la síntesis de ácidos grasos, mencionados anteriormente, se expresan en el cerebro. Neuronas y células gliales necesitan la síntesis de lípidos para mantener su homeostasis metabólica. Es importante destacar que ACC, AMPK, CPT1, FAS y MCD son altamente expresadas en los núcleos hipotalámicos implicados en la homeostasis energética: ARC, DMH, PVH y VMH (Lopez et al., 2007a; Lage et al., 2008; Dieguez et al., 2009). Curiosamente, los tratamientos con inhibidores de FAS, como son cerulenin o C75, producen una pérdida de masa asociada a una hipofagia marcada (Loftus et al., 2000). Es de destacar que el efecto anorexigénico de estos fármacos, especialmente de C75, está mediado por la acumulación de malonil-CoA en el hipotálamo, que es percibido como una señal de abundancia de nutrientes (Hu et al., 2003). El efecto anorexigénico de los inhibidores de FAS se asocia con

una disminución en la expresión de neuropéptidos orexigénicos (AgRP y NPY) y un incremento en la expresión de neuropéptidos anorexigénicos (CART, POMC) en el ARC, aunque los mecanismos moleculares no están esclarecidos completamente (Loftus et al., 2000) (Gao and Lane, 2003; Lopez et al., 2006). Por otro lado, la inhibición farmacológica o la ablación genética de la actividad de CPT1 hipotalámico provoca una reducción en la ingesta de alimento (Wolfgang et al., 2006; Obici et al., 2003). Mientras la activación hipotalámica de CPT1 en el contexto de una disminución de los niveles de malonil-CoA después del tratamiento con ghrelin, provoca un incremento en la ingesta (Lopez et al., 2008).

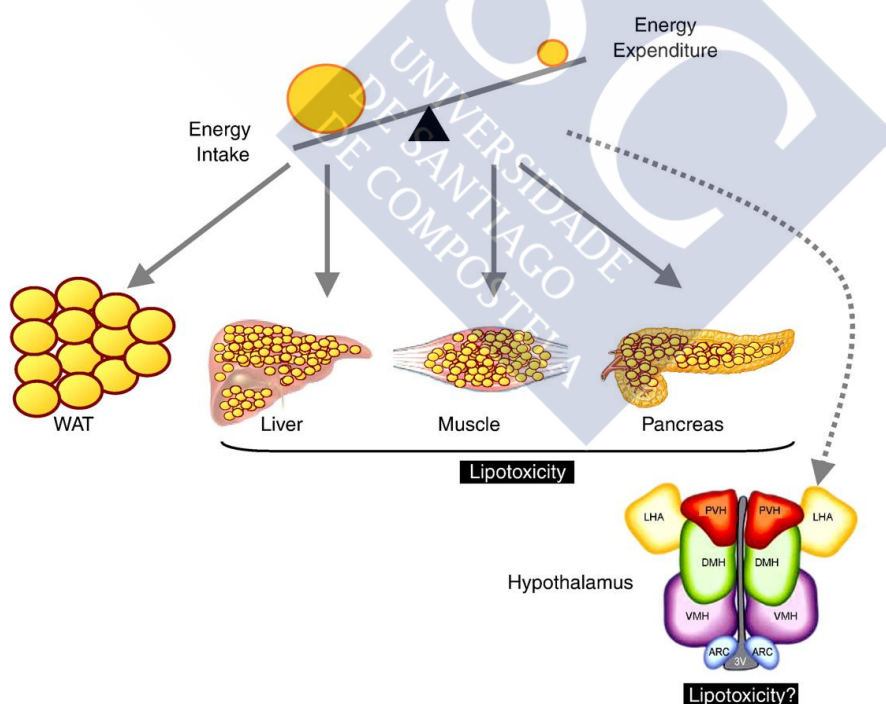


**Ilustración 3.** Metabolismo lipídico hipotalámico: integra señales periféricas con los sistemas de neuropéptidos. (Dieguez et al., 2009)

### **LIPOTOXICIDAD Y ER ESTRÉS**

Aunque es obvio que el desarrollo de la obesidad es causado por un balance energético positivo, no está muy claro porque la expansión del WAT hacia otros tejidos característica de los individuos obesos está fuertemente asociado con resistencia a insulina y diabetes (Haffner, 2006; Virtue and Vidal-Puig, 2008). Una de las hipótesis que se sugiere es que la obesidad lleva consigo un fracaso en la capacidad de expansión del tejido adiposo. Aunque el WAT posee un amplio grado de expansión, su capacidad de almacenamiento puede saturarse produciéndose un exceso de grasa redireccionado hacia otros tejidos que no son adecuados para el

almacenamiento de lípidos. Bajo estas condiciones en estas células, el exceso de lípidos que llega desde el WAT o desde la lipogénesis *de novo* entra en vías no oxidativas. Esto lleva a la producción de especies lipídicas reactivas como son los diacilgliceroles o las ceramidas, que inducen una respuesta tóxica específica en estos órganos y pueden promover la apoptosis. Esta acumulación de especies reactivas se produce sobre todo en células  $\beta$ , hígado, riñón, corazón y músculo esquelético y se conoce con el nombre de lipotoxicidad (Lee et al., 1994; Zhou et al., 2000; Unger, 2002; Lelliott and Vidal-Puig, 2004; Medina-Gomez et al., 2007; Eizirik et al., 2008). La lipotoxicidad ha sido vinculada al músculo esquelético y a la esteatosis hepática asociada a resistencia a insulina (Farrell and Larter, 2006; Marra et al., 2008; Medina-Gomez et al., 2007; Unger, 2002). La lipotoxicidad también puede ocurrir en el CNS como se observó en ciertos desórdenes neurodegenerativos como Parkinson o esclerosis amiotrófica lateral (Hayashi et al., 2005; Ilieva et al., 2007; Matus et al., 2008). En base a esto se plantean varias dudas acerca de si la lipotoxicidad ocurre en áreas del cerebro involucradas en el control del balance energético (como el hipotálamo) y si esto tiene relevancia fisiopatológica. Como hemos visto antes, los lípidos juegan un papel clave en la regulación del balance energético en el área hipotalámica por lo que puede haber un papel fisiopatológico de la lipotoxicidad (**Ilustración 4**).



**Ilustración 4.** La lipotoxicidad se produce en diversos tejidos periféricos pero también en el sistema nervioso central, aunque aquí sus efectos fisiopatológicos no están del todo claros. (Martinez de Morentin et al., 2010).

Los mecanismos por los cuales los lípidos pueden llegar a ser tóxicos es a través de la inflamación o bien a partir de la inducción de estrés en el retículo endoplasmático (Unger, 2002; Virtue and Vidal-Puig, 2008). El retículo endoplasmático (*endoplasmic reticulum*, ER) es un orgánulo presente en todas las células eucariotas que forman una red interconectada de sacos de membrana y es la principal ubicación para el plegamiento, modificaciones post-transcripcionales y transporte, de proteínas secretoras, lumenales y de membrana; además está implicado en el almacenamiento de calcio y biosíntesis lipídica (Cunard, 2015; Ramirez and Claret, 2015). En circunstancias normales, las proteínas mal plegadas se envían al citosol por parte del ER para llevar a cabo una degradación proteosómica. Sin embargo, a veces diversas perturbaciones celulares prolongadas pueden alterar esta homeostasis del ER, provocando una condición de estrés (*ER stress*), lo que lleva a la acumulación de proteínas mal plegadas con carácter tóxico. Hace años, se vio que esta acumulación de proteínas mal plegadas en el ER, inducía la expresión de unas proteínas reguladas por glucosa (*glucose-regulated proteins*, GRPs) y posteriormente se activaba una compleja ruta de señalización conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response*, UPR) (Kozutsumi et al., 1988; Walter and Ron, 2011; Lee and Ozcan, 2014) que regulaba la estructura de la membrana del ER y secretaba proteínas con capacidad procesadora de una manera dinámica y coordinada (Rutkowski and Hegde, 2010; Arendsdorf et al., 2013). La UPR incrementa la capacidad de plegado del ER mediante la regulación de la traducción de mRNA de chaperonas y inhibiendo la traducción de la mayoría de las proteínas. La activación coordinada de estas rutas está diseñada para reducir rápidamente la carga del retículo y restaurar su homeostasis, sin embargo pueden iniciarse las rutas de muerte celular (programas de autofagia y apoptosis) cuando la homeostasis en el ER no es restablecida en períodos prolongados de tiempo (Schroder and Kaufman, 2005; Cunard, 2015).

La UPR está mediada por tres clases principales de sensores proteicos transmembrana que son regulados negativamente por una chaperona conocida como proteína de unión a la cadena pesada de inmunoglobulina (*chaperone immunoglobulin heavy chain binding protein*, BIP/GRP78). En condiciones de estrés, se produce un aumento de proteínas mal plegadas y esto promueve la disociación de BIP de estos sensores y posteriormente su activación para intentar aliviar esta sobrecarga mediante la reducción de la traducción, el aumento de la capacidad de plegamiento de las proteínas o bien la degradación irreversible de proteínas mal plegadas (Lee and Ozcan, 2014; Walter and Ron, 2011; Ramirez and Claret, 2015). Las tres ramas de la UPR son:

- Proteína kinasa del ER (*PKR-like ER kinase*, PERK): proteína transmembrana del ER tipo I. En condiciones de estrés, se produce la homodimerización de PERK, su autofosforilación y la activación del dominio

kinasa; una vez activado se inhibe el factor alpha 2 de iniciación de la traducción eucariota (*α eukaryotic translation initiation factor 2*, eIF2α), reduciendo así la síntesis de proteínas y la carga de ER estrés (Harding et al., 2000; Ma et al., 2002).

- IRE (*Inositol-requiring protein-1*): es una endonucleasa ER tipo I; existen dos isoformas IREα y IREβ (papel no muy claro en las UPR) (Tirasophon et al., 1998). En condiciones normales IREα existe como monómero asociado a GRP78, sin embargo bajo condiciones de ER estrés, se produce su homodimerización y autofosforilación seguido de la liberación de GRP78, y posteriormente la catalización del *splicing* del mRNA de la proteína de unión box-X 1 (*X-box binding protein 1*, XBP1) generando un potente factor de transcripción llamado XBP1s. Esta proteína modula la expresión de los genes de la ruta UPR involucrados en el plegamiento de proteínas y la generación de ER (Bertolotti et al., 2000; Gardner and Walter, 2011; Lee et al., 2002; Calton et al., 2002).

- Factor de transcripción activador 6 (*Activating transcription factor 6*, ATF6): proteína transmembrana ER tipo II; ATF6 está retenido en la membrana del retículo mediante su asociación fisiológica con GRP78 en condiciones normales (sin ER estrés) (Haze et al., 1999). Cuando se desarrollan perturbaciones en el lumen del retículo, la disociación de GRP78 permite que ATF6 sea trasladado al aparato de Golgi donde es procesado por diferentes proteasas (Shen et al., 2002; Adachi et al., 2008). El extremo N-terminal de ATF6 es liberado y migra al núcleo donde regula la transcripción de varios genes diana relacionados con el plegamiento de proteínas, incluyendo XBP1 (Haze et al., 1999; Adachi et al., 2008).



**Ilustración 5.** Ruta de las UPR con sus tres proteínas principales. (Lee and Ozcan, 2014).

Un gran número de estudios han demostrado que la ruta de señalización UPR y el ER estrés están asociados con fisiopatologías y cambios metabólicos incluyendo obesidad, diabetes tipo 2, enfermedades del hígado y desordenes neurodegenerativos (Park and Ozcan, 2013). Estudios pioneros (Ozcan y colaboradores, 2014) demostraron que existía una estrecha relación entre ER estrés y obesidad (Ozcan et al., 2004). En ratones o ratas alimentados con dieta alta en grasa se ha observado ER estrés a nivel hipotalámico (Ozcan et al., 2009; Cakir et al., 2013;

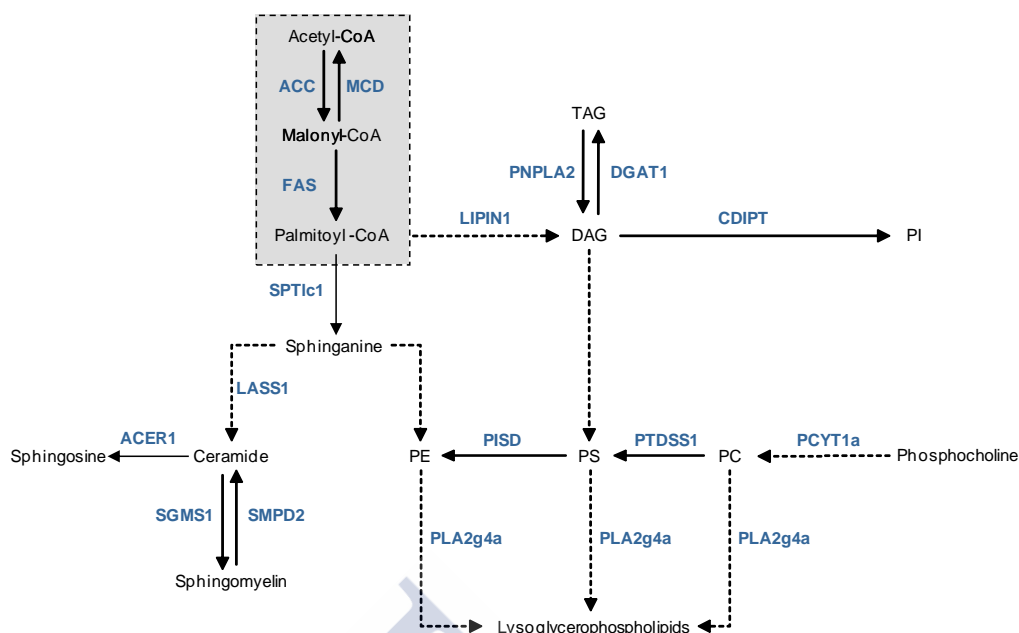
Contreras et al., 2014b), esto también se observó en modelos genéticos (Won et al., 2009; Schneeberger et al., 2013). La administración ICV de inductores farmacológicos del ER estrés altera la señalización de la leptina (Ozcan et al., 2009; Hosoi et al., 2008; Hosoi et al., 2008) mientras tratamientos con chaperonas químicas alivia el ER estrés hipotalámico y disminuye la masa corporal en ratones ob/ob (Won et al., 2009) al mismo tiempo que induce una mejoría en la sensibilidad a insulina y la homeostasis de la glucosa en ratones obesos y diabéticos (Ozcan et al., 2006). El ER estrés en el hipotálamo también contribuye a la resistencia a insulina; la administración central de insulina no suprime la ingesta de alimentos cuando se produce ER estrés agudo a nivel cerebral (Won et al., 2009). A nivel periférico, en el hígado y tejido adiposo de ratones obesos produce resistencia a insulina y diabetes tipo II (Ozcan et al., 2004). Además, se ha observado que alteraciones como el colesterol y ácidos grasos libres inducen ER estrés (Feng et al., 2003) y que la inflamación, la acumulación de lípidos y la hiperglicemia en células  $\beta$  pancreáticas e hígado provoca la activación de las UPR, conduciendo a una disminución en la expresión y señalización de la insulina (Ozcan et al., 2004; Lipson et al., 2006; Kammoun et al., 2009; Fu et al., 2012; Contreras et al., 2014b).

Como se mencionó antes, dentro de las especies lipídicas reactivas que dan lugar a la lipotoxicidad una de las más importantes son las ceramidas. Las ceramidas son una familia de lípidos formados por una esfingosina covalentemente unida a un ácido graso de longitud y grado de saturación variable. Aunque antiguamente se pensaba que eran simplemente componentes de las membranas celulares, en los últimos años se ha visto que prácticamente todos los estímulos que provocan estrés (calor, radiación ultravioleta, hipoxia, estrés oxidativo, etc) incrementan la producción de ceramidas como parte de una respuesta celular conservada evolutivamente (Hannun and Luberto, 2000; Hannun and Obeid, 2002; Sawai and Hannun, 1999). Tres vías son las principales para la producción de ceramidas: 1) la síntesis *de novo*: ocurre en el ER y es la mejor caracterizada de las tres rutas. Se sintetizan ceramidas a través de moléculas menos complejas; la serina C-palmitoiltransferasa (SPT) es la enzima limitante en esta ruta transformando palmitato más serina en 3-oxo-dihidroesfingosina. Posteriormente, el 3-oxo-dihidroesfingosina es reducido a dihidroesfingosina, la cual es entonces seguida por la acilación llevada a cabo por la enzima ceramida sintasa (CerS) para producir dihidroceramida. La reacción final para producir ceramida es catalizada por la dihidroceramida desaturasa (Des 1 o 2). Varias de estas enzimas implicadas en la síntesis *de novo* de ceramidas son inducidos por eventos inflamatorios aumentados durante la obesidad (Bikman and Summers, 2011). La inhibición farmacológica o la inhibición genética de algunas de estas enzimas produce un potente efecto sobre el metabolismo energético celular (Holland and Summers, 2008). 2) Otra de las rutas es la hidrólisis de esfingomielinas a través de la enzima esfingomielinasa (o esfingomielina fosfodiesterasa, SMase) que cataliza la hidrólisis de las esfingomielinas. Las

esfingomielinas son el esfingolípido más abundante en mamíferos por lo que son una enorme sustrato para la síntesis de ceramidas. Existen algunos estudios sobre el papel de este enzima en la función metabólica y en la obesidad. Los niveles de SMase ácida están elevados en el tejido adiposo de ratones obesos (Samad et al., 2006). Interesantemente, aquellos humanos que poseen el síndrome de Niemann que se caracteriza por la ausencia de la actividad de SMase ácida, tienen problemas para ganar y mantener el peso corporal, lo mismo ocurre en los modelos animales (CROCKER and FARBER, 1958; Garver et al., 2007). 3). La vía de rescate o recuperación: las ceramidas pueden ser producidas a través del catabolismo de otros complejos de esfingolípidos. La degradación de esfingolípidos se produce en los endosomas y lisosomas. Mediante una serie de eventos los esfingolípidos de orden superior se degradan dentro de los compartimentos celulares con naturaleza ácida gracias a las enzimas residentes (SMasa ácida y ácido  $\beta$ -glucosidasa 1) para formar ceramidas (40-42), que es degradada a esfingosina y ácidos grasos libres para ser capaz de entrar al citosol. Una vez en el citosol, la esfingosina se convierte de nuevo a través de la ceramidasa (Bikman and Summers, 2011) (**Ver Ilustración 6**).

Un incremento en la producción de ceramidas puede dar lugar a ER estrés (Kahn et al., 2006; Holland and Summers, 2008; Bikman and Summers, 2011). En relación con esto, la inhibición farmacológica o la ablación genética global de la síntesis *de novo* de ceramidas provoca una mejora en la sensibilidad a insulina y en la homeostasis de la glucosa (Summers et al., 1998; Yang et al., 2009a). Otras evidencias indican que los niveles de ceramidas en el cerebro están incrementados en obesidad inducida por dieta alta en grasa (Borg et al., 2012) y que los niveles hipotalámicos regulados por CPT1c (isoforma específica localizada en el ER) median los efectos orexigénicos de ghrelin (Ramirez et al., 2013). Recientemente, nuestro grupo demostró que la lipotoxicidad hipotalámica inducida por ceramidas y el ER estrés provocan un descenso en el tono simpático hacia el BAT, lo que produce un descenso en la termogénesis y una ganancia de masa corporal independiente de la ingesta (Contreras et al., 2014b). Sin embargo, no existen muchos datos que vinculen la lipotoxicidad o el ER estrés con las hormonas tiroideas.





**Ilustración 6.** Esquema de la ruta de síntesis de ceramidas.

## SENSORES ENERGÉTICOS

### AMPK

AMPK (AMP *activated protein kinase*) es una proteína muy bien conservada en eucariotas. Es el componente *downstream* de una cascada de kinasas que actúa en un amplio rango de niveles celulares, además de considerarse un sensor celular de los niveles de energía. En los últimos años, se ha demostrado que AMPK está también involucrada en la regulación del balance energético a nivel de todo el cuerpo respondiendo a señales hormonales y señales nutricionales que conducen a cambios en la homeostasis energética. La relevancia fisiológica de AMPK fue demostrada por el hecho de que el deterioro en las funciones de AMPK está asociado con alteraciones metabólicas, resistencia a insulina, obesidad, desordenes hormonales y enfermedad cardiovascular (Carling et al., 1987; Andersson et al., 2004; Kahn et al., 2005; Carling et al., 2008; Lage et al., 2008; Blanco Martinez de et al., 2011).

A nivel molecular, AMPK es un complejo heterotrimérico formado por una subunidad  $\alpha$  catalítica con un dominio *protein kinasa* serina/treonina convencional, y dos subunidades reguladoras,  $\beta$  y  $\gamma$ . En mamíferos, cada subunidad es codificada por múltiples genes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ) que resulta en 12 posibles combinaciones de complejos AMPK. La subunidad  $\alpha$

contiene un dominio kinasa N-terminal y un dominio C-terminal involucrado en la formación del complejo con las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ ; la subunidad  $\beta$  contiene un dominio C-terminal muy combinado que son capaces por si mismos de forma un complejo con la subunidad  $\gamma$  (Lage et al., 2008).

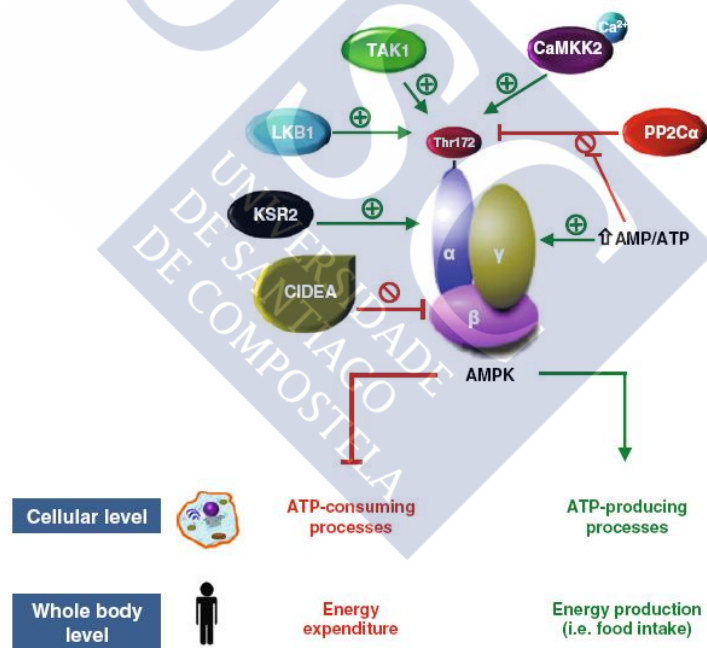
La regulación de la actividad de AMPK involucra por un lado una estimulación alostérica por un incremento en el ratio intracelular AMP/ATP así como por su fosforilación; la activación requiere la fosforilación de la treonina 172 (Thr-172) en la subunidad catalítica  $\alpha$  por una kinasa *upstream* sensible a AMP (Ponticos et al., 1998; Hawley et al., 1996). Se han identificado dos kinasas AMPK *upstream*: el supresor de tumores LKB1 (*Liver Kinase B1*) y la proteína kinasa de la kinasa dependiente de calcio y calmodulina (*Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase*, CaMKK 1 y 2; CaMKK1 o CaMKK2, también llamadas CaMKK $\alpha$  y CaMKK $\beta$ , respectivamente) (Woods et al., 2005; Carling et al., 2008; Hawley et al., 2005). Aunque in vivo, la isoforma 2 parece ser más importante. Algunas publicaciones señalan también a la proteína fosfatasa 2C  $\alpha$  (*protein phosphatase 2C alpha*, PP2C $\alpha$ ) como un inhibidor de AMPK mediante una desfosforilación (Hurley et al., 2005; Steinberg et al., 2006b; Hardie, 2007) y otras publicaciones, muestran que la proteína TAK1 (*Transforming growth factor-beta-activated kinase*) activa AMPK (Woods et al., 2003; Hawley et al., 2005; Xie et al., 2006) y la kinasa supresora de Ras (*kinase suppressor of Ras*, KSR2) interactúa con la subunidad  $\alpha$ 1 de AMPK, modulando su actividad (Costanzo-Garvey et al., 2009) (**Ilustración 7**).

Un primer mecanismo de activación de AMPK definido postula que AMPK es activado alostéricamente por AMP, que también inhibe PP2C $\alpha$  incrementando la fosforilación en Thr172 y por tanto activando AMPK; este se conoce como mecanismo de regulación dependiente de AMP (Sanders et al., 2007; Lage et al., 2008); sin embargo estudios recientes postulan otro mecanismo independiente de AMP llamado modelo de activación dependiente de Ca<sup>2+</sup>: el incremento de Ca<sup>2+</sup> conduce a la activación de CaMKK $\beta$ , que incrementa la fosforilación en Thr172 y se activa AMPK; este mecanismo ocurre sin necesidad del incremento de AMP (Sanders et al., 2007). Finalmente, se reveló otro mecanismo que modula la actividad de AMPK; este implica la formación de un complejo entre la subunidad  $\beta$  de AMPK y CIDEA (*Cell-death-inducing likeeffector A*) que provoca la degradación de AMPK mediada por ubiquitinación reduciendo así su actividad (Qi et al., 2008).

La visión clásica de AMPK, es como un sensor de energía intracelular que modula el balance energético dentro de la célula. En muchos tejidos, la activación de AMPK (su fosforilación) provoca la inactivación de todos aquellos procesos consumidores de ATP mientras se promueven los procesos catabólicos para la producción de ATP y restaurar así el ratio AMP:ATP (Kahn et al., 2005; Carling et al., 2008; Lage et al., 2008). La reducción de la

actividad de AMPK en tejidos periféricos como el músculo, el hígado y el tejido adiposo, provoca una reducción de la capacidad de ejercicio, de la tolerancia a la glucosa y una predisposición a la obesidad y la diabetes (Steinberg et al., 2006a) (Stark et al., 2013).

Además de en la periferia, AMPK actúa como un sensor clave en el balance energético mediante la integración de señales nutricionales y hormonales en el hipotálamo. AMPK actúa en neuronas hipotalámicas, vinculando el estado metabólico de neuropéptidos clásico, con el sistema de neurotransmisores que regulan la alimentación. Se ha observado que AMPK es expresado en varios núcleos hipotalámicos como el ARC, PVH, VMH y LHA (Minokoshi et al., 2004a; Lopez et al., 2008; Lage et al., 2008; Lopez et al., 2006). El ayuno incrementa la actividad de AMPK en múltiples regiones del hipotálamo y la realimentación la inhibe (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004a; Lopez et al., 2008). Por otro lado la activación de AMPK en el hipotálamo incrementa la ingesta y la ganancia de masa corporal, mientras que su inhibición promueve la hipofagia y la pérdida de masa (Minokoshi et al., 2004b)(Andersson et al., 2004; Lopez et al., 2007a).



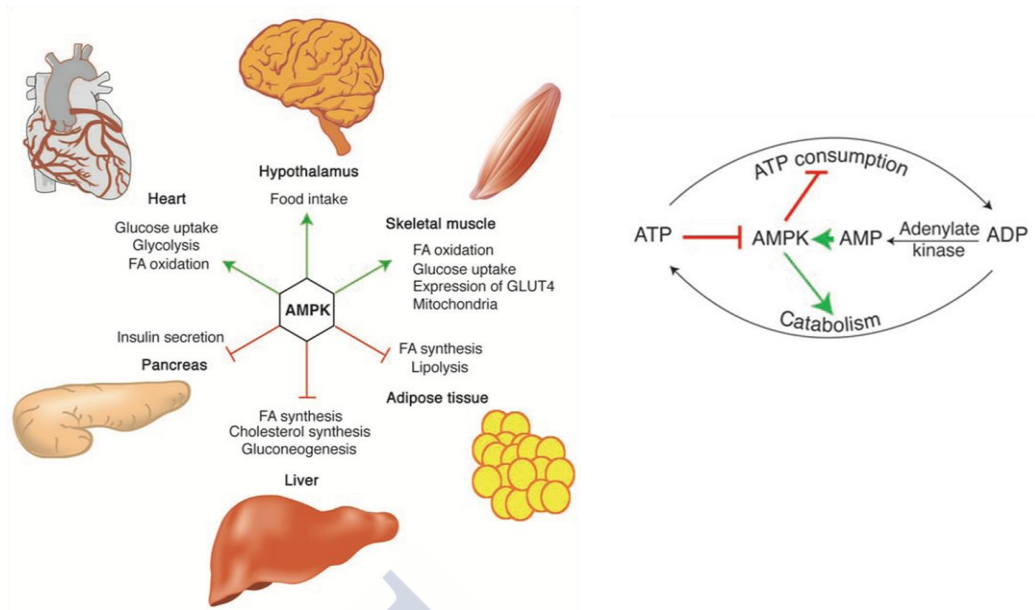
**Ilustración 7.** Estructura y regulación de AMPK. (Blanco Martinez de et al., 2011)

Como hemos mencionado antes, AMPK es un modulador clave de la ruta metabólica hipotalámica de los ácidos grasos. La activación de AMPK provoca la fosforilación e inhibición de ACC, y una disminución de la expresión del mRNA de FAS a través de la proteína SREBP1; como resultado se produce una disminución marcada en los niveles de malonil-CoA, lo que estimula la actividad de CPT1, y esto lleva a un incremento en la ingesta (Lopez et al.,

2008; Kola et al., 2005; Minokoshi et al., 2004a; Minokoshi et al., 2008). Se establece así un eje crucial para el control de la homeostasis energética formado por AMPK-malonil CoA-CPT1 que media no solo efectos en la periferia sino también a nivel central. Señales anorexigénicas como la leptina, la insulina o GLP-1 inhiben AMPK a nivel hipotalámico, provocando un incremento en la actividad de ACC (Minokoshi et al., 2004a; Andersson et al., 2004; Seo et al., 2008; Gao et al., 2007; Wolfgang et al., 2007). Por el contrario, señales orexigénicas como los cannabinoides, los glucocorticoides, ghrelin, hormonas tiroideas o AgRP, activan AMPK a nivel hipotalámico (Kola et al., 2005; Lopez et al., 2008; Lopez et al., 2010b; Ishii et al., 2008). Sin embargo, hay excepciones, la resistina (RSTN) a pesar de poseer un efecto anorexigénico provoca la activación de AMPK (Vazquez et al., 2008). Claret y colaboradores, hipotetizaron que AMPK regulaba el balance energético y el apetito por medio de sus acciones en neuronas AgRP y POMC en el ARC. La delección de la subunidad  $\alpha 2$  en neuronas AgRP causa un fenotipo delgado con un incremento en la sensibilidad hacia el antagonista de las melanocortinas, pero sin cambios en la ingesta. Por otra parte la delección en la subunidad  $\alpha 2$  en neuronas POMC reduce el gasto energético e incrementa la ganancia de masa corporal (Claret et al., 2007a).

Varios modelos animales con delecciones selectivas en las subunidades de AMPK han sido generados para el estudio de su papel en el metabolismo energético y la obesidad. Ratones deficientes en AMPK $\alpha 2$  a nivel global alimentados con dieta alta en grasa (Viollet et al., 2003) y ratones deficientes en AMPK $\alpha 2$  pero en neuronas POMC alimentados con dieta estándar y dieta alta en grasa muestran una elevada masa corporal y masa grasa (Claret et al., 2007b; Long and Zierath, 2006). Por el contrario ratones con ablación selectiva de AMPK $\alpha 2$  en neuronas AgRP muestran un fenotipo delgado dependiente de la edad (Claret et al., 2007a). Estos datos parecen indicar el importante papel que AMPK desarrolla en el ARC en el control de la ingesta. Otros ratones como los ratones deficientes en AMPK $\beta 1$  en condiciones de dieta alta en grasa o dieta normal tienen reducida su ingesta, su adiposidad y su masa corporal total pero sin cambios en el ratio metabólico, la actividad física, la lipólisis del tejido adiposo y la lipogénesis (Dzamko et al., 2010). La ausencia de alteraciones en el peso corporal o en la ingesta en algunos de estos modelos animales se relaciona posiblemente con la compensación que existe entre las restantes subunidades catalíticas; por ejemplo en el caso del ratón deficiente en AMPK $\alpha 2$  los niveles de expresión de AMPK $\alpha 1$  están incrementados (Viollet et al., 2003). Sin embargo, el fenotipo obeso de los ratones POMC $\alpha 2$  KO no se debe a la compensación por la sobreexpresión de AMPK $\alpha 1$  (Claret et al., 2007a). Por tanto, el desarrollo de otros modelos de animales focalizados en subunidades específicas de AMPK en núcleos hipotalámicos concretos o en poblaciones neuronales, ayudarán a aclarar el papel de AMPK en la fisiología de la obesidad y en la respuesta a metabolitos periféricos.

Muchas de las acciones de AMPK como modulador de la ingesta las ubican en el núcleo ARC, pero AMPK en el VMH se ha demostrado que posee un papel más integrador. Últimas investigaciones colocan al AMPK hipotalámico como un regulador central de la termogénesis a través del sistema nervioso autónomo (*autonomic nervous system*, ANS) y a través del VMH. Nuestro grupo, examinó los efectos de las hormonas tiroideas sobre AMPK a nivel central y sobre el metabolismo energético. El hipertiroidismo o la inyección central de T3 en el hipotálamo provocan una reducción de la masa corporal sin verse afectada la ingesta. Como consecuencia, se produce un incremento en la termogénesis (incremento de la expresión de UCP1 y PGC1 $\alpha$ ) por estimulación del SNS a través de los receptores  $\beta$ 3 adrenérgicos. Al inyectar T3 directamente en el VMH (alta coexpresión de AMPK y de TR) se observaba una disminución en la actividad de AMPK y un aumento en la actividad nerviosos simpática en el BAT. Por otro lado, la inyección central de AICAR o de un adenovirus AMPK constitutivamente activado, revertía los efectos en la pérdida de peso, reducía los niveles de malonil-CoA y la expresión de marcadores termogénicos en BAT. La inyección en el VMH de un adenovirus dominante negativo para AMPK, inducía pérdida de peso, incrementaba los niveles de malonil-CoA y provocaba un aumento en el programa termogénico en BAT (Lopez et al., 2010b). Este estudio, muestra que las hormonas tiroideas inactivan AMPK en el VMH y provocan el aumento de la activación de la termogénesis, lo que conduce a una pérdida de masa sin afectar a la ingesta. De manera similar la administración central de nicotina, estrógenos o liraglutide (un análogo de GLP-1 de uso clínico) inhiben también la actividad de AMPK en el hipotálamo, lo que conduce a la activación del SNS y de la expresión de los marcadores termogénicos UCP1 y UCP3 en el BAT. Además la inhibición de la ruta lipogénica en el VMH impide la activación del BAT mediada a nivel central por nicotina o estrógenos, revirtiendo la pérdida de peso asociada a la administración central de estas sustancias (Cannon and Nedergaard, 2010; Martínez de Morentin et al., 2012a; Martínez de Morentin et al., 2014a; Seoane-Collazo et al., 2014; Beiroa et al., 2014). Así, el AMPK hipotalámico no sólo regula el apetito, sino que también regula el gasto energético.



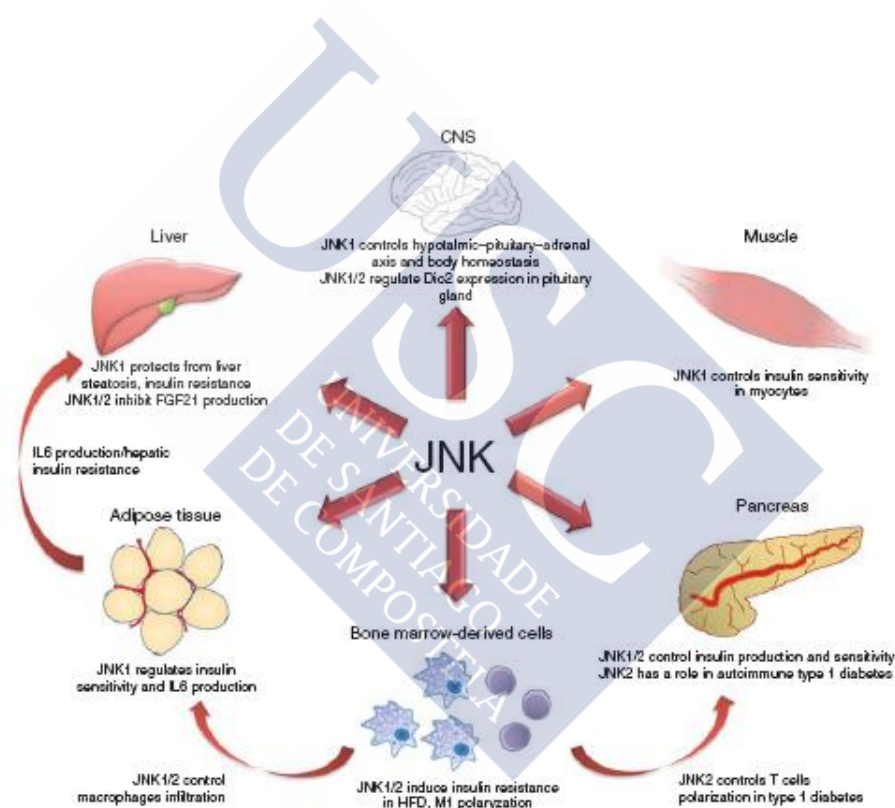
**Ilustración 8.** Esquema de las acciones de AMPK en tejidos periféricos. (Hardie, 2004)

### **KINASAS C-JUN AMINO TERMINALES ( JUN amino-terminal kinases, JNKs)**

Kinasas c-JUN amino terminales (JNKs), también conocidas como kinasas activadas por estrés (SAPKs, *stress-activated protein kinases*) constituyen una familia de proteínas de transducción de señales que son activadas bajo diversas circunstancias. JNKs son componentes de una cascada de señalización clásica de proteínas kinasas activadas por mitógenos (*MAPK, mitogen-activated protein kinase*) que sirven para amplificar la señal filtrando y permiten así la diversidad de la señalización. JNKs regula la expresión de genes a través de la fosforilación y activación de factores de transcripción como cJUN o ATF2 (Gupta et al., 1995), o bien por la regulación de la estabilidad de mRNA (Chen et al., 1998). Tres genes codifican los miembros de la familia JNK (*Jnk1, Jnk2* y *Jnk3*); mientras *Jnk1* y *Jnk2* son ampliamente expresados, *Jnk3* se expresa específicamente en el cerebro, los testículos y el corazón (Davis, 2000; Chang and Karin, 2001; Manieri and Sabio, 2015). Pero se ha observado que la actividad de JNK es mayor en el cerebro que en cualquier otro tejido dentro de los mamíferos (Coffey and Courtney, 1997; Coffey, 2014; Hu et al., 1997; Kuan et al., 2003) lo que sugiere que los miembros de esta familia de kinasas son reguladores clave dentro del CNS. Cada miembro de JNKs puede ser expresado en varias variantes que pueden ser separadas en dos grupos en función de su tamaño: las formas cortas sobre 46 kDa (JNK1 $\alpha$ 1, JNK1 $\beta$ 1, JNK2 $\alpha$ 1, JNK2 $\beta$ 1, JNK3 $\alpha$ 1) y las formas largas sobre 54 kDa (JNK1 $\alpha$ 2, JNK1 $\beta$ 2, JNK2 $\alpha$ 2, JNK2 $\beta$ 2, JNK3 $\alpha$ 2) (Sabio and Davis, 2014; Manieri and Sabio, 2015).

JNK es activado en respuesta a un amplio rango de estímulos: citoquinas (IL6, TNF $\alpha$ ), ambientes estresantes (hipoxia, radiación ionizante), toxinas, drogas y cambios metabólicos incluyendo la obesidad y la hiperlipidemia. La obesidad causa una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado que conduce a la activación de rutas de estrés, incluyendo la de JNK1; esta es la principal isoforma que ha sido implicada en el desarrollo de la obesidad y resistencia a insulina (Hirosumi et al., 2002), aunque JNK2 podía tener también un papel en esto (Tuncman et al., 2006) (**Imagen 9**). La ablación del gen *Jnk1* en ratones (*shRNA*) o bien su inhibición farmacológica protege contra la resistencia a insulina inducida por obesidad (Hirosumi et al., 2002; Kaneto et al., 2004; Bennett et al., 2003; Nakatani et al., 2004; Sabio and Davis, 2010). Por otra parte, los estudios en ratones deficientes en JNK1 a nivel global en todo el cuerpo han mostrado que esta kinasa controla la acumulación de lípidos y la absorción de lípidos en hígado (Imbernon et al., 2013). Los adipocitos durante la obesidad son objeto de estímulos de estrés, de tal forma que la obesidad debida a alteraciones genéticas o inducidas por dieta, activa JNK1 en el tejido adiposo (Hirosumi et al., 2002). Sin embargo, los ratones condicionales para JNK1 generados sobre tejidos periféricos sensibles a la insulina (Sabio et al., 2008; Sabio et al., 2009; Sabio and Davis, 2010; Sabio et al., 2010b), no englobaban el fenotipo que se generaba con ratones JNK1 *knock out* totales, lo que sugería la posibilidad de que la activación de JNK1 pero a nivel del CNS podía contribuir al mantenimiento del balance energético y del metabolismo de la glucosa. La activación de JNK en el hipotálamo durante la obesidad se ha relacionado con el ER estrés, la inflamación y la hiperlipidemia (Ozcan et al., 2004; Prada et al., 2005a; Prada et al., 2005b). En 2010, dos grupos independientes generaron dos modelos JNK1 *knock out* condicionales en áreas específicas del cerebro (Sabio et al., 2010a; Belgardt et al., 2010b) usando un sistema de *Nestin-cre* (permite abolir el gen de interés en neuronas y astrocitos del CNS (Tronche et al., 1999)); ambos estudios mostraron que estos ratones estaban protegidos contra la obesidad inducida por dieta alta en grasa, resistencia a insulina e intolerante a la glucosa a nivel central y periférico (Belgardt et al., 2010b; Sabio et al., 2010a). Por otro lado, tenían reducida la acumulación de lípidos en el BAT mientras los niveles plasmáticos de T3 y T4 estaban elevados, lo que se correlacionaba con los altos niveles de TRH en el hipotálamo. Estos datos parecían indicar que JNK1 en el CNS controlaba la homeostasis corporal mediante la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Sabio et al., 2010a). Ratones carentes de JNK1 en todas las neuronas, presentaban un fenotipo metabólico con el gasto energético elevado (esto se correlacionaba con los niveles altos de T3), una ligera pérdida de masa pero ningún cambio en la masa grasa con respecto a los controles, por lo que no quedaba claro si estaban protegidos contra la obesidad (Belgardt et al., 2010b). Otros modelos de ratones surgieron para intentar aclarar el papel de JNK en el CNS; ratones que sobreexpresaban JNK1 en neuronas AgRP, desarrollaban obesidad cuando eran alimentados con dieta alta en grasa, además de convertirse en resistentes a la leptina a nivel neuronal y sistémico (Tsaousidou et al.,

2014). Estos resultados indicaban que JNK y en particular JNK1 desempeñaba un papel fundamental en el control de la obesidad a nivel del CNS. Además, se ha demostrado que la ablación selectiva de JNK1 en el hipotálamo y en la hipófisis mediante un sistema de *Nestin-Cre* conduce a la activación del eje tiroideo, mostrando un incremento de TRH-R y TSH $\beta$  en la hipófisis así como niveles circulantes de T3 elevados (Belgardt et al., 2010b). Por tanto, JNK1 es un regulador negativo de la sensibilidad a insulina, del eje tiroideo y del crecimiento, aunque las poblaciones neuronales implicadas en estos efectos no han sido definidas (Belgardt et al., 2010a). Podríamos decir que JNK1 ha sido implicado en la regulación de la ingesta y en el metabolismo periférico de la glucosa (Unger et al., 2010; Belgardt et al., 2010a; Belgardt et al., 2010b; Tsaousidou et al., 2014), pero sin embargo su implicación en el metabolismo lipídico no ha sido muy estudiado.



**Ilustración 9.** Acciones de las isoformas de JNK sobre órganos específicos en el metabolismo. JNK juegan un papel crucial en el metabolismo; las funciones de JNK1 y JNK2 son específicas de algunos órganos y han sido extensamente estudiados modelos animales. (Manieri and Sabio, 2015).



### **TERMOGÉNESIS: el tejido adiposo pardo**

El balance energético es la diferencia entre la energía que obtiene un individuo a través de la ingesta y la energía que gasta este individuo (gasto energético, GE). Dentro del GE, podemos diferenciar entre la termogénesis obligatoria (energía consumida por un individuo en reposo, ayunas y en condiciones de termoneutralidad; asociada a reacciones metabólicas esenciales) y la termogénesis facultativa o adaptativa (el calor producido por el músculo (tiritando) y el tejido adiposo pardo como respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica).

El tejido adiposo pardo a pesar de estar compuesto por células grasas es totalmente diferente al tejido adiposo blanco. Sus adipocitos muestran una forma poligonal con una gran cantidad de gotas lipídicas citoplasmáticas pequeñas (multiloculares), un núcleo central y un gran número de mitocondrias en los adipocitos; los lípidos son su fuente primaria de combustible para la fosforilación oxidativa y la producción de calor (Cannon and Nedergaard, 2004; Contreras et al., 2014a). La gran cantidad de mitocondrias existentes en las células del BAT es fundamental para que se produzcan la fosforilación oxidativa y la termogénesis (Ricquier, 2005). La membrana interior de las mitocondrias posee unos transportadores específicos para el intercambio de ADP-ATP, fosfato, citrato, glutamato y malato. Además mantienen un gradiente electroquímico muy grande generado por la cadena de transporte electrónico necesaria para la conservación de la energía y para la síntesis de ATP en la mitocondria así como para su uso (Brand et al., 1999) (Ricquier, 2005).

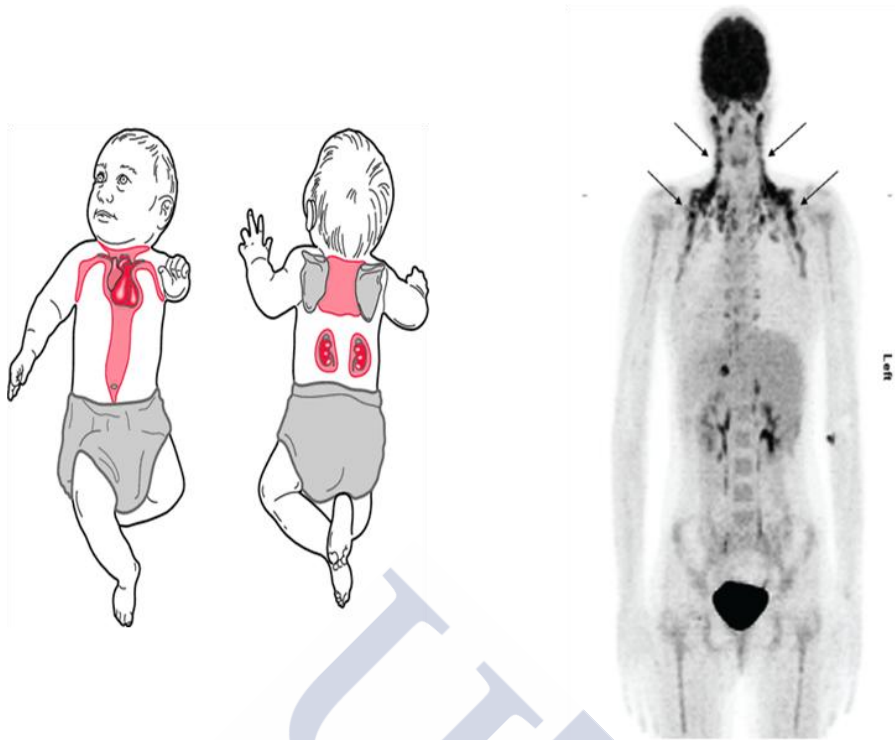
El BAT puede considerarse un órgano altamente activo siendo considerado el principal sitio donde ocurre la termogénesis sin temblor, que es facilitada a través del desacoplamiento de la respiración mitocondrial para la producción de ATP, y mediada por la proteína desacoplante 1 (*UCP1, uncoupling protein 1*) también conocida con el nombre de termogenina y que está localizada en la membrana mitocondrial interna y es un excelente marcador de este tejido (Contreras et al., 2014a; Cannon and Nedergaard, 2004; Whittle et al., 2011). Esta proteína disocia la cadena de transporte electrónico para la producción de calor, permitiendo el libre movimiento de protones a través de la membrana mitocondrial (Whittle et al., 2011). La función termogénica del BAT y UCP-1 ha sido extensamente estudiada. Ratones con el BAT reducido genéticamente son propensos a desarrollar obesidad sin embargo ratones deficientes en UCP-1 no son propensos a ganar masa corporal (Lowell and Flier, 1997). Por otra parte los ratones carentes de UCP-1 son extremadamente sensibles al frío (Enerback et al., 1997; Feldmann et al., 2009). Estos datos sugieren que podían existir mecanismos adicionales que pueden controlar el gasto energético además de UCP-1. Posteriormente se identificaron otros dos miembros de la familia de las proteínas desacoplantes: UCP-2 ampliamente expresada en muchos tejidos, y UCP-3 expresada principalmente en el BAT y en el músculo esquelético. Se ha demostrado que ratones deficientes en UCP-2 y UCP-3 tampoco presentaban una significativa predisposición a hipotermia, reducido gasto energético u obesidad (Arsenijevic et al., 2000;

Vidal-Puig et al., 2000). Es posible que existan mecanismos de compensación entre estas proteínas.

Recientes evidencias señalan un segundo tipo de adipocitos marrones encontrados tanto en humanos como en roedores. Se encontró que tras estímulos termogénicos podían aparecer células de grasa parda en determinados sitios anatómicos correspondientes al WAT. Estos adipocitos beige (*brite*, *Brown in White*) derivan de células precursoras que se diferencia desde células clásicas del BAT pero sin embargo están más próximas al linaje celular de un adipocito blanco (Sharp et al., 2012; Wu et al., 2012; Lee et al., 2014b). Aunque el origen y la ubicación anatómica es diferente a la del BAT, este nuevo linaje celular presenta todas las características morfológicas y moleculares de un adipocito marrón clásico y termogénicamente actúa como un adipocito marrón (Seale et al., 2008; Petrovic et al., 2010; Shabalina et al., 2013). Sin embargo la capacidad termogénica de este nuevo tipo celular in vivo es mucho más baja que los adipocitos marrones. Este proceso de diferenciación se conoce como *browning*.

El BAT está ampliamente inervado por el sistema nervioso simpático (SNS) lo que hace que tenga una respuesta mucho más rápida a su estimulación, un hecho clave en su función termogénica (Lafontan and Berlan, 1993; Robidoux et al., 2004; Cannon and Nedergaard, 2004). La acción simpática, y por tanto su activación, sobre los adipocitos pardos maduros se ejerce principalmente a través de los receptores adrenérgicos  $\beta_3$  ( $\beta_3$ -AR) (Cannon and Nedergaard, 2004), mientras que los  $\beta_1$ -AR parecen ser los principales responsables de la acción noradrenérgica sobre la proliferación de pre-adipocitos pardos (Bronnikov et al., 1999).

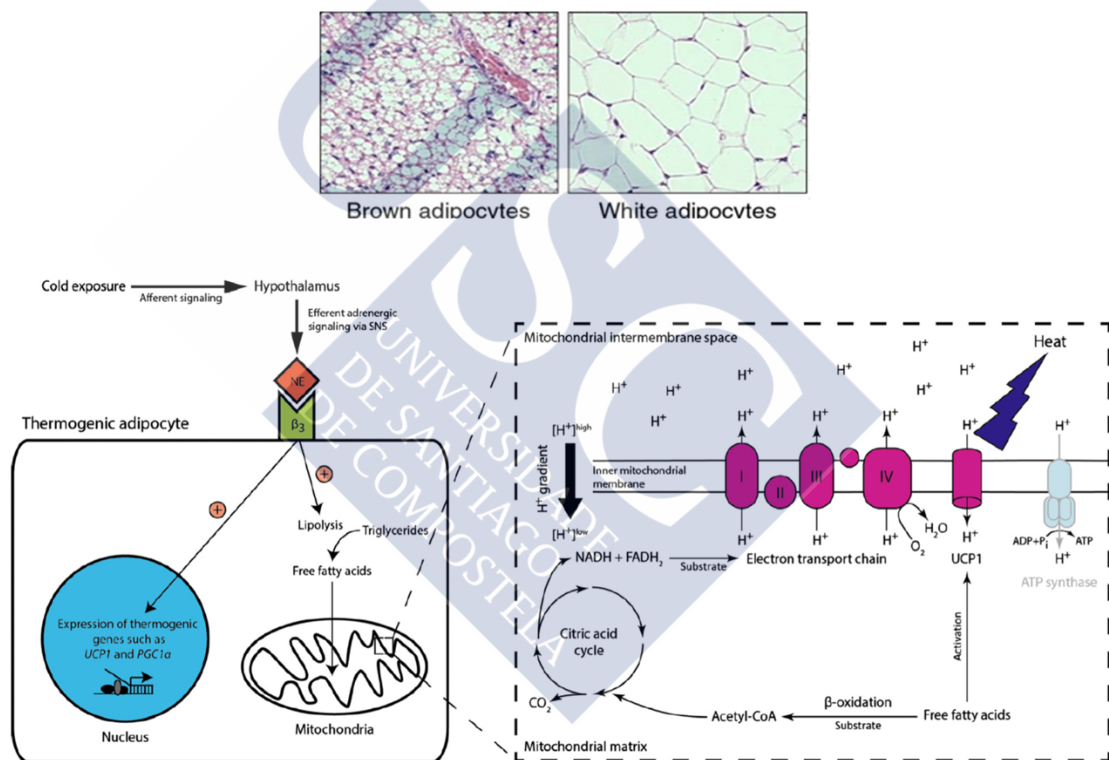
La generación de calor o termogénesis, es muy importante en todos los animales homeotérmicos para mantener la temperatura corporal interna estable, independientemente de las influencias externas; puede ser regulada a través de señales hormonales o neuronales (Silva, 2006). Aunque clásicamente se creía que la importancia del BAT en humanos adultos no era significativa, la aplicación de una nueva técnica conocida como tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada (PETC/CT) combinada con *18F-fluorodeoxyglucose* (*18F-FDG*) mostró la presencia de este tejido en humanos adultos y su actividad (**Ilustración 10**). Se vio que poseía localizaciones de este tejido adiposo pardo alrededor del cuello, clavícula y médula espinal, metabólicamente activos y capaces de captar y utilizar glucosa y ácidos grasos (Orava et al., 2011; Townsend and Tseng, 2014; Zingaretti et al., 2009). A raíz de estas nuevas evidencias surgieron numerosos estudios para demostrar la importancia de este tejido en los adultos (Cypess et al., 2009; Orava et al., 2011; Zingaretti et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Vijgen et al., 2013; Yoneshiro et al., 2011) y se despertó gran interés la posibilidad de su manipulación para su uso como una diana terapéutica contra la obesidad (Cypess et al., 2014).



**Ilustración 10.** Distribución del tejido adiposo pardo en recién nacidos y en el humano adulto (visualizado por  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT). (Fenzl and Kiefer, 2014)

Para la activación de la termogénesis, una señal es transmitida vía SNS a los adipocitos maduros del BAT. Los nervios simpáticos que inervan el BAT conducen a la liberación de norepinefrina (NE, *norepinephrine*) y este neurotransmisor activa los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -ARs) expresados en los adipocitos marrones (se expresan mayoritariamente en grasa), principalmente el subtipo  $\beta_3$ . Estimulado el receptor, la proteína G asociada a él provoca la activación de la adenilato ciclasa (AC, *adenylate cyclase*), incrementando cAMP, que a su vez activa la protein kinasa A (PKA, *protein kinase A*), induciendo la termogénesis (Contreras et al., 2014a; Cannon and Nedergaard, 2004). La PKA tiene efectos en BAT tanto agudos como crónicos; el efecto agudo incrementa la lipólisis conduciendo a un incremento de ácidos grasos libres (FFA, *free fatty acid*) en el citosol; este proceso ocurre por la activación de la lipasa adiposa de triglicéridos (ATGL, *adipose triglyceride lipase*), la lipasa sensible a hormonas (HSL, *hormone-sensitive lipase*) y la lipasa monoacilglicerol (MGL, *monoacylglycerol lipase*), que de forma secuencial hidrolizan triglicéridos para liberar FFAs. Estos FFAs son luego importados dentro de la mitocondria a través de la carnitina palmitoiltransferasa 1a (CPT1a, *carnitine palmitoyltransferase 1a*), donde son oxidados a través de la  $\beta$ -oxidación o el ciclo del ácido cítrico, conduciendo a la formación de NADH y FADH, que serán luego oxidados en la cadena de transporte electrónico. Esto lleva a un bombeo de protones fuera de la matriz mitocondrial y a la creación de un gradiente de protones que conduce de nuevo los protones

hacia dentro de la matriz mitocondrial pasando a través de UCP1; la energía producida en ese gradiente de protones es luego liberada, conduciendo así a la producción de calor por parte de la mitocondria (Contreras et al., 2014a; Nedergaard et al., 1980; Nedergaard and Cannon, 1984; Cannon and Nedergaard, 2004; de Jesus et al., 2001) (**Ilustración 11**). La capacidad de disipar energía que posee el tejido adiposo pardo es significativa dado su potencial para aumentar el gasto de energía hasta en un 20% en los seres humanos. Además existen varios factores que lo hacen atractivo para el tratamiento de la obesidad desde una perspectiva bioenergética. Cuando está activo, el tejido adiposo pardo es capaz de captar y disponer de una gran cantidad de lípidos y de glucosa desde la circulación (Whittle et al., 2011; Bartelt et al., 2011). Además su alta vascularización hace que los efectos de la termogénesis se puedan transferir a lo largo de todo el cuerpo (Roman et al., 2014). Esta característica lo hace muy beneficiosos sustancialmente para los pacientes obesos que sufren a su vez resistencia a la insulina y hiperlipidemia.



**Ilustración 11.** Imagen representativa de los adipocitos en BAT y WAT. Esquema de la activación de la termogénesis en el BAT por la exposición al frío. (Lidell et al., 2014a; Lidell et al., 2014b)

### Regulación central de la termogénesis

La termogénesis en mamíferos es activada y coordinada por el hipotálamo vía sistema nervioso simpático (Townsend and Tseng, 2014). Diferentes estímulos como la exposición al

frio, la fiebre o el incremento en la ingesta calórica, llegan como señales al cerebro y son coordinados en un área específica (Cannon and Nedergaard, 2004; Whittle et al., 2011).

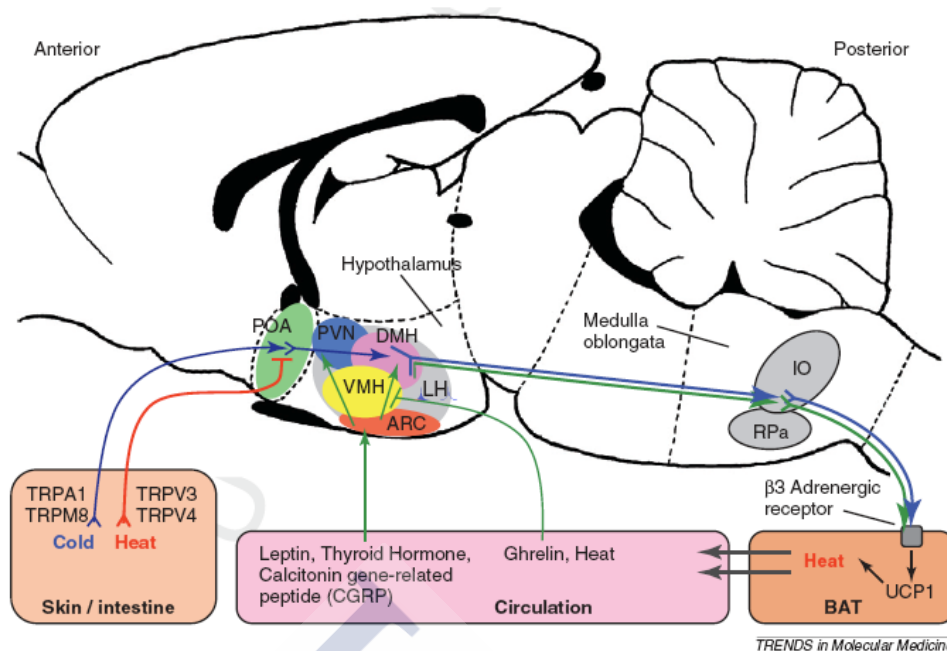
La información sobre la temperatura es detectada por termorreceptores situados en la superficie del cuerpo y se transmite principalmente al área preóptica (POA), que es un centro termorregulador situado en el polo rostral del hipotálamo (Srividya et al., 2006)). Por muchos años, el área preóptica ha sido considerada la única región en el CNS responsable del control de la termorregulación, donde se localizaban neuronas sensibles al frío (Satinoff et al., 1976; Imai-Matsumura et al., 1984; Boulant, 2000) y neuronas sensibles al calor que están activas en condiciones de termoneutralidad produciendo señales inhibitorias para suprimir la termogénesis (Morrison et al., 2012). El POA también recibe señales desde las áreas termo sensibles ubicadas por todo el cuerpo. Cuando se produce la estimulación eléctrica o por frío de esta área se activa el BAT y la termogénesis (Holt et al., 1987; Thornhill and Halvorson, 1994; Thornhill et al., 1994; Imai-Matsumura et al., 1984). Dentro del POA, su parte medial (MnPO), la estimulación glutamatérgica con N-metil-D-aspartato (*N-methyl-D-aspartate*, NMDA) induce respuestas fisiológicas que imitan una respuesta defensiva contra el frío. Por el contrario, la estimulación del POA medial (MPO) o POA lateral (LPO) no recapitulan este efecto (Nakamura and Morrison, 2008). Por otra parte, esta área POA proyecta a otros núcleos centrales, modulando la termogénesis. De hecho, la destrucción de la VMH suprime la capacidad de la señalización de enfriamiento externo al POA para poder estimular BAT (Hogan et al., 1982; Preston et al., 1989), lo que sugiere que la activación del BAT por el POA se lleva a cabo a través del VMH. De hecho, el VMH fue el primer núcleo del hipotálamo en identificar su implicación en la termogénesis; se vio que en la estimulación eléctrica de este núcleo se incrementaba la temperatura del BAT y que además este efecto se eliminaba bloqueando los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos (Holt et al., 1987; Perkins et al., 1981). Además la inyección de glutamato, noepinefrina, o serotonina directamente en el VMH provoca un efecto directo en la activación del BAT (Yoshimatsu et al., 1993; Hugie et al., 1992; Sakaguchi and Bray, 1989).

Anatómicamente existe una conexión entre el VMH y el BAT. Existen evidencias de que el VMH es infectado trans-sinápticamente desde el BAT con el virus de la pseudorrabia (Bamshad et al., 1999). Además, existen varias áreas del tronco cerebral, como los núcleos rafe pálido (*raphe pallidus*, RPA) y la oliva inferior (*inferior olive*, IO), dos núcleos que han sido funcionalmente ligados a la regulación de la termogénesis en BAT (Morrison, 1999; Morrison and Madden, 2014; Morrison et al., 2014), donde las neuronas del VMH se han postulado para modular la actividad del sistema nervioso simpático (Cannon and Nedergaard, 2004). Recientemente, evidencias genéticas apoyan el papel del VMH en la modulación termogénica del BAT. Ratones knock out en SF-1 en el VMH muestran una reducción en el gasto energético y en la expresión de UCP-1 en BAT (Kim et al., 2011; Jo, 2012).

La termogénesis en BAT parece estar regulada por dos mecanismos entrelazados: mecanismos termorreguladores y la influencia y detección de nutrientes por parte del cerebro (Whittle et al., 2011). Se han identificado poblaciones neuronales en el hipotálamo y en el tronco cerebral que emiten proyecciones eferentes hacia el BAT, con una notable concentración de estas poblaciones en el PVH, donde la modulación endógena de neuropéptidos puede conducir a un marcado incremento de la termogénesis en BAT (Verty et al., 2010). Estudios farmacológicos y la ablación postembrionaria las neuronas orexigénicas en el ARC han revelado que conducen a un fenotipo delgado en ratones, asociado con hipofagia y la activación del programa termogénico en BAT (Bewick et al., 2005). En el LHA, el bloqueo de la acción de la MCH conduce a una bajada de masa corporal acompañada de un aumento de la masa del BAT interescapular y la expresión de UCP-1 (Pereira-da-Silva et al., 2003). Por otra parte en este mismo núcleo, los clústeres neuronales que expresan OX-A parecen inducir la activación del programa termogénico en el BAT (Pereira-da-Silva et al., 2003).

Otras moléculas periféricas que son potentes reguladores del balance energético y del apetito también pueden provocar efectos sobre la termogénesis en el BAT a través de acciones en el hipotálamo. Así, la leptina induce la termogénesis en el BAT a partir de sus acciones sobre núcleos hipotalámicos como el DMH y el VMH (Toda et al., 2009; Harlan et al., 2011; Zhang et al., 2011; Harlan et al., 2011). El bloqueo de la señalización de la leptina a nivel hipotalámico, revierte su efecto sobre la ingesta e incrementa la activación del SNS hacia el BAT (Rahmouni et al., 2009). Estas evidencias sugieren que la leptina puede utilizarse como diana terapéutica para controlar la activación de la termogénesis. De manera opuesta, la administración central de leptina provoca una supresión de la actividad simpática del BAT (por la reducción de la liberación de noradrenalina) y la ablación de su receptor, da como resultado un aumento de la termogénesis y del gasto energético en BAT (Mano-Otagiri et al., 2009).

Nuestros estudios previos señalan a que es AMPK en el VMH la llave reguladora negativa de la actividad simpática sobre la termogénesis de BAT, integrando señales periféricas como por ejemplo THs, estradiol, GLP1, BMP8b y drogas como la nicotina (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2012a; Martinez de Morentin et al., 2014a; Beiroa et al., 2014). Todos estos datos llevaron a postular la existencia de un eje entre AMPK-SNS-BAT como mecanismo de modulación de la homeostasis energética con posibles implicaciones en el tratamiento de la obesidad (Lopez et al., 2013). Esto supone un interesante objeto de estudio para las acciones centrales de las hormonas tiroideas sobre la termogénesis a nivel periférico.



**Ilustración 12.** Regulación térmica y nutricional de la actividad del SNS en el BAT (Whittle et al., 2011). Las líneas azules y rojas representan circuitos termogénicos neuronales respondiendo al frío y al calor, respectivamente. Las líneas verdes representan señales nutricionales.

### LAS HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas controlan un amplio rango de procesos metabólicos, como son el crecimiento, el desarrollo y la tasa metabólica. Las hormonas tiroideas son producidas en la glándula tiroidea, localizada en la porción anterior del cuello y formada por dos lóbulos laterales conectados por un istmo. Esta glándula produce principalmente tiroxina (3,3',5,5'-tetrayodotironina, T4) que posee una actividad biológica baja pero es la forma en la que se localiza la mayoría en sangre y es precursora de la forma activa, la triyodotironina (3,5,3'-triyodotironina, T3), que se produce tras la eliminación de una molécula de yodo del anillo exterior, incrementando así su actividad (Cheng et al., 2010; Brent, 2012; Warner and Mittag, 2012). T3 regula la producción de energía y la tasa metabólica, teniendo profundos efectos en la función cardíaca, hepática y neuro-muscular, así como en el crecimiento natal, postnatal y el desarrollo (Visser and Visser, 2012; Franklyn and Boelaert, 2012). Este crítico paso en la activación de las TH es mediado por un grupo de enzimas conocidos como deydodasas (ver más abajo), tipo 1 y tipo 2 (D1 y D2). Existe una deydodasa tipo 3 (D3) que inactiva ambas T4 y T3: convierte la T3 en la 3,5-diyodo-L-tironina (T2) y la T4 en 3,3'-5'-triyodotironina (rT3 o reverse T3) (Arrojo E Drigo and Bianco, 2011; Brent, 2012; Cheng et al., 2010). T4 y T3 son

producidas por células foliculares a través de la yodación de los residuos de tirosina en la glucoproteína llamada tiroglobulina, aunque la mayoría de la T3 circulante es generada de forma periférica por la conversión de T4 a T3 gracias a las deydinasas intracelulares (Mebis and Van den Berghe, 2009a; Mebis and Van den Berghe, 2011; Brent, 2012). La glándula tiroidea también produce la calcitonina (secretada por las células parafoliculares e involucrada en la regulación de los niveles de calcio y fósforo en suero y la remodelación esquelética, junto con la hormona paratiroidea y la vitamina D)(Little, 2006a). En el suero, las hormonas tiroideas se unen a proteínas de transporte de hormonas tiroideas como son la globulina fijadora de tiroxina (TBG, *T4-binding globulin*), transtiretina (TTR, *transthyretin*) y la albumina (Mebis and Van den Berghe, 2009b).

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea controla los niveles de T4 y T3, a través de un control de *feedback* negativo, principalmente, mediante el incremento o descenso de la demanda metabólica, aunque existen otros factores que pueden afectar al control de este balance como son algunas enfermedades, las drogas, las enfermedades tiroideas, los desórdenes en la hipófisis e incluso la edad (Little, 2006b; Mebis and Van den Berghe, 2009a; Mebis and Van den Berghe, 2011). Bajo condiciones normales, el hipotálamo (en el PVH) se produce la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en respuesta a estímulos externos como son enfermedad, estrés, demanda metabólica y bajos niveles de T3. La TRH estimula la hipófisis para liberar la hormona estimulante de tiroidea (TSH, *thyroid-stimulating hormone*), que actúa directamente en el receptor de TSH expresado en las células foliculares de la tiroidea, causando la secreción de la pro-hormona T4 y en menor medida de T3. Esto, altos niveles de T4 y T3 cesan la liberación de TSH y bajos niveles la incrementan (Little, 2006a; Mebis and Van den Berghe, 2009a; Brent, 2012).

La ruta de activación de la tiroxina es mediada por un grupo de enzimas llamadas yodotironina deydinasas que elimina el yodo de la molécula de T4 y sus derivados; existen tres tipos: tipo 1 (D1), tipo 2 (D2), y una deydinasa inactivante, la tipo 3 (D3). Estas tres enzimas constituyen un grupo de proteínas (*dimeric integral membrane thioredoxin fold-containing proteins*) que pueden activar o inactivar las hormonas tiroideas (Bianco and Kim, 2006; Mebis and Van den Berghe, 2009b; de Jesus et al., 2001). Las deydinasas son determinantes para mantener el pool de T3 citoplasmático, la concentración nuclear de T3 y la saturación de TR (**Ilustración 13**).

D1 está localizada en la membrana plasmática, con un dominio transmembrana anclado en la membrana y con un dominio globular catalítico hacia el citosol; el gen *Dio1* es altamente sensible a T3. Este tipo de deydinasa es expresada en la glándula tiroidea, el hígado, el riñón y la glándula pituitaria; provoca la bioactivación de T4 a T3 por deydinización (Bianco and Kim, 2006; Mebis and Van den Berghe, 2009a) y su actividad está regulada por T3 a nivel transcripcional, con un incremento en la actividad de D1 durante el hipertiroidismo y un



descenso en el hipotiroidismo (Mebis and Van den Berghe, 2009b). D1 es una enzima cinéticamente ineficiente cuyo papel en la fisiología del cuerpo no está muy clara (Bianco and Kim, 2006).

D2 es la principal enzima activadora de la T4 y tiene una elevada afinidad por el sustrato; está localizada en el retículo endoplasmático, de este modo la producción mediada por D2 ocurre intracelularmente. Esta enzima se expresa en el cerebro, la glándula tiroidea, el músculo esquelético y la glándula pituitaria anterior; su función es convertir T4 a su forma activa T3 y la rT3 convertirla en 3,5-diiodo-L-tironina (T2). Es esencial para la producción local de T3 (Mebis and Van den Berghe, 2009b; Mebis and Van den Berghe, 2011; Arrojo E Drigo and Bianco, 2011).

D3 abunda en muchos tejidos durante las etapas tempranas del desarrollo; cuando el embrión está maduro, la expresión de D3 disminuye mientras la de D2 se incrementa, provocando un aumento en la señalización de las hormonas tiroideas hasta después del nacimiento y hasta la edad adulta. Es localizada en la membrana plasmática, y está presente en la piel, cerebro, varios tejidos fetales, el útero gestante y la placenta. Esta deiodinasa media la degradación de la hormona tiroidea: cataliza la conversión de T4 hacia 3,3'-5'-triyodotironina (T3 o reverse T3) y la de T3 hacia T2 (Arrojo E Drigo and Bianco, 2011; Arrojo E Drigo et al., 2013; Herwig et al., 2008).

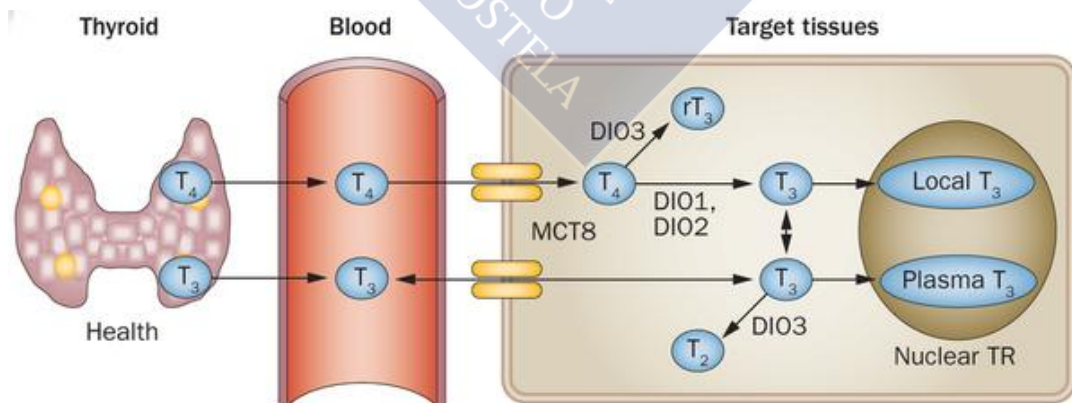
Tanto las deiodasas como los receptores de hormonas tiroideas (TRs, *thyroid hormone receptors*) están situados intracelularmente. Las THs necesitan transportadores de membrana para entrar al citoplasma debido a su carácter no lipídico. Han sido identificados varios transportadores de dichas hormonas: 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).

Dentro de la familia MCT, probablemente una de los transportadores más importantes es el MCT8. Este transportador está localizado en diferentes tejidos como el hígado y el cerebro (incluyendo el hipotálamo, el mayor sitio de integración de la regulación génica y *feedback* de las THs) y es altamente selectivo para las THs (Friesema et al., 2010; Friesema et al., 2012; Martagon et al., 2013; Brent, 2012). MCT8 es muy importante para la captación y el flujo de las THs a través de la barrera hematoencefálica y las neuronas (Martagon et al., 2013). La mayor ruta de entrada de la T4 en el cerebro es a través de dicha barrera hematoencefálica; una vez dentro del cerebro, dos de los principales transportadores específicos que existen aquí son el polipéptido transportador de aniones orgánicos 1c1 (OATP1C1, *organic anion-transporting polypeptide 1c1*) y MCT8; se podría decir que el principal transportador de T4 en el cerebro es OATP1C1 y para la T3 es el MCT8 (Lazar, 1993; Herwig et al., 2008) (**Ilustración 13**).

La bioactividad de las THs puede ser modulada a nivel de sus receptores nucleares que actúan como factores transcripcionales ligando dependientes; existen tres receptores funcionales con similar afinidad por la unión a T3 y codificados por dos genes: TR $\alpha$  y TR $\beta$  (Mebis and Van den Berghe, 2009a). Una vez dentro de la célula, T3 puede interactuar con receptores TH y activar o inactivar la respuesta de genes. Dos genes, TR $\alpha$  y TR $\beta$ , codifican siete receptores identificados que mediante un proceso de *splicing* alternativo o por el sitio de iniciación de la transcripción, producen las diferentes isoformas (Herwig et al., 2008).

Los transcritos del gen TR $\beta$  producen tres proteínas de unión a ligando (TR $\beta$ 1-3) con una región C-terminal conservada, incluyendo dominios DNA y de unión a ligando pero con diferentes porciones N-terminal. La situación es más compleja con el gen TR $\alpha$ ; uno de los dos mayores productos de este gen, TR $\alpha$ 1, da lugar a un receptor-ligando, mientras el otro genera tres principales isoformas llamadas TR $\alpha$ 2, TR $\alpha$ 3 y TR $\alpha$ 4, que no se unen al ligando pero tienen capacidades de unión a DNA, aunque su función in vivo no está clara (Warner and Mittag, 2012; Brent, 2012; Lopez et al., 2010b).

TR $\alpha$ 1 y TR $\beta$ 1 tienen una distribución muy extensa, mientras TR $\beta$ 2 está mucho menos distribuido y su expresión está localizada en algunos tipos de células incluyendo neuronas TRH en el PVH y células tirotropas en la pituitaria (Costa-e-Sousa RH and Hollenberg, 2012; Lechan et al., 1993). Los humanos con mutaciones en el desarrollo de TR $\beta$  desarrollan resistencia central a TH, indicando la importancia de esta isoforma en humanos (Costa-e-Sousa RH and Hollenberg, 2012). Los TRs están ampliamente distribuidos en todo el cerebro incluyendo la expresión de la mayoría de isoformas, en el ARC en el VMH y en el PVH, en donde se colocan con neuronas TRH (Herwig et al., 2008).



**Ilustración 13.** Síntesis y transporte de hormonas tiroideas (Wiersinga, 2014).

### Las hormonas tiroideas y el metabolismo

Se sabe desde hace mucho tiempo que las THs incrementan la tasa metabólica basal. El papel de las THs en la regulación de la homeostasis energética es evidente en aquellos pacientes que padecen algún desorden tiroideo. El hipertiroidismo es un síndrome clínico caracterizado por la sobreactivación de la glándula tiroidea de forma que se produce una sobreproducción de T3 y T4, conduciendo a un exceso de hormonas tiroideas circulantes. Esto lleva a un aumento en el consumo de oxígeno y la producción de calor, resultando en un incremento en la tasa metabólica, pérdida de peso, incremento de la ingesta calórica y taquicardias (Lopez et al., 2010b; Warner and Mittag, 2012; Yehuda-Shnaidman et al., 2013). El 85% de los pacientes con tirotoxicosis muestran una pérdida de peso, a pesar de que muchos de ellos tiene un elevado consumo de comida (Brent, 2012; Silva, 2006; Bianco, 2011). En el otro extremo, el hipotiroidismo, con niveles de T3 reducidos, poseen elevada sensibilidad al frío, descenso del gasto energético, ganancia de masa a pesar de un descenso en la ingesta y bradicardia (Alkemade et al., 2005; Alkemade, 2010; Warner and Mittag, 2012; Yehuda-Shnaidman et al., 2013; Kim, 2008). Recientes estudios epidemiológicos han mostrado una incidencia de hasta un 20% de hipotiroidismo en pacientes obesos, sugiriendo el importante papel de las THs en el desarrollo de la obesidad (Pearce, 2012; Kaptein et al., 2009). Muchos de estos efectos han sido conectados a acciones directas de las THs en los tejidos metabólicamente activos, como son el hígado, el WAT, el BAT, el músculo esquelético y el corazón (Warner and Mittag, 2012; Lopez et al., 2010b; Silva, 2003; Silva, 2006; Klein and Ojamaa, 2001).

### Las hormonas tiroideas: termogénesis y gasto energético

Las THs son cruciales para la ‘termogénesis obligatoria’, la producción de calor debido a la tasa metabólica; junto a la termogénesis obligatoria, las THs también modulan la ‘termogénesis facultativa’, es decir, la producción de calor bajo demanda, cuando la temperatura ambiental desciende por debajo de la termoneutralidad (Silva, 2006; Cannon and Nedergaard, 2004; Whittle et al., 2011). Los sitios y mecanismos de acción para la termogénesis facultativa divergen entre las dos clases de animales homeotermos; en pájaros el principal sitio de termogénesis facultativa es el músculo esquelético (Silva, 2006) mientras en mamíferos incluyendo los humanos, ocurre principalmente en el BAT (Cannon and Nedergaard, 2004; Cannon and Nedergaard, 2010; Nedergaard et al., 2007).

El BAT es una diana de las THs y tiene un largo número de TRs  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  (Hernandez and Obregon, 1996; Silva, 1995). TR $\alpha 1$  es necesario para mantener la capacidad de respuesta normal de los adipocitos marrones, mientras TR $\beta$  media la expresión génica de UCP1 inducida por T3 (Ribeiro et al., 2001; Ribeiro et al., 2010). Los ratones deficientes en TR $\alpha$  son

intolerantes al frío y muestran una marcada incapacidad en la termogénesis en el BAT (Marrif et al., 2005). La deficiencia global de TR $\alpha$ 1 y TR- $\alpha$ 1/ $\beta$ , así como la delección de todas las isoformas de TR $\alpha$  (Thra-0/0), conduce a hipotermia y intolerancia al frío asociada a termogénesis reducida en el BAT, pero no en la termogénesis obligatoria, debido a la respuesta inducida por NE, a pesar de que la morfología del BAT, desarrollo y reclutamiento son normales (Marrif et al., 2005; Wikstrom et al., 1998; Johansson et al., 1999). Los modelos de animales *knockout* en deydinasas aportan también una interesante información sobre el papel de las THs en la función del BAT. D2 es esencial para mediar la respuesta termogénica del BAT a la estimulación adrenérgica debido al incremento de la conversión de T4 a T3 dentro del tejido; ratones con una alteración en el gen *Dio2* (D2KO) tienen dañado las vías de la lipólisis y la lipogénesis conduciendo a una disfunción en el BAT (de Jesus et al., 2001; Christoffolete et al., 2004; Castillo et al., 2011). En estos modelos, al igual que ocurre en animales hipotiroideos, se observa una disfunción en el BAT que conduce a una forma de termogénesis adaptativa más demandante energéticamente, induciendo resistencia a la obesidad. (Sjogren et al., 2007; Liu et al., 2003; Marsili et al., 2011).

Recientes evidencias han cambiado el dogma periférico, demostrando que la acción de las THs en la termogénesis del BAT es también mediada centralmente y que los efectos metabólicos a nivel de todo el cuerpo que se observan en el hipertiroidismo pueden ser relacionados con una acción central, en lugar de un efectos directo de dichas hormonas sobre los adipocitos del BAT (Sjogren et al., 2007; Lopez et al., 2010b).

La primera evidencia que demostró que los efectos metabólicos de las THs están centralmente mediados fue abarcado en un estudio de Vennström et al. (Sjogren et al., 2007) usando un ratón heterocigoto para un mutante de TR $\alpha$ 1 con baja afinidad por T3; este ratón era hipermetabólico, con incremento en el consumo de oxígeno, menor cantidad de masa grasa, incremento en la ingesta y resistencia a obesidad inducida por dieta. El hipermetabolismo de este ratón fue explicado por la elevada actividad del BAT, es decir, incremento en la termogénesis y el gasto energético; a pesar de esto, no presentaba incremento en la temperatura corporal debido a la alteración de la función vascular en la cola, conduciendo a una inapropiada disipación de calor (Warner et al., 2013). Estas alteraciones metabólicas fueron neutralizadas tras la denervación funcional de la señal simpática hacia el BAT, indicando que el CNS controlaba el metabolismo de estos ratones actuando a través de del sistema nervioso autónomo (Sjogren et al., 2007).

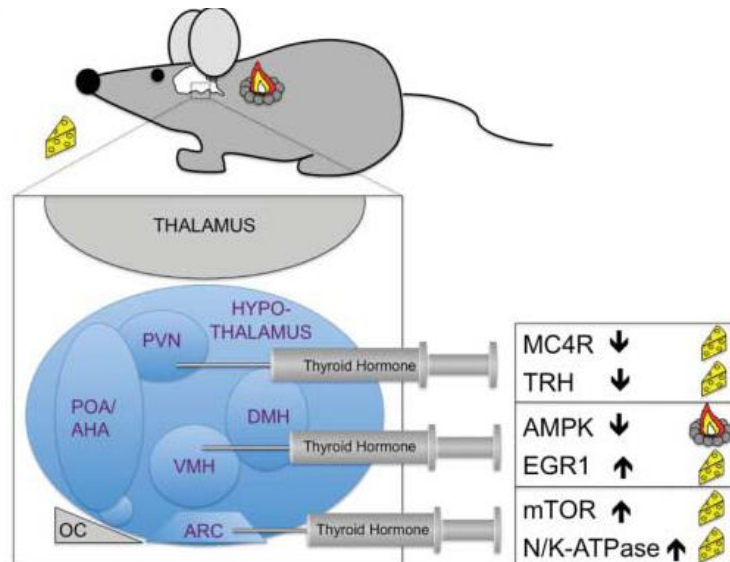
Evidencias mostradas por nuestro grupo han unido la actividad de AMPK con la termogénesis inducida por THs a través de la modulación del SNS (Lopez et al., 2010b).

### Las hormonas tiroideas y la ingesta

Alteraciones en el estado tiroideo están asociadas con cambios en los patrones de alimentación tanto en humanos como en roedores (Pijl et al., 2001; Lopez et al., 2010b; Gonzalez et al., 2012). El efecto orexigénico de las THs es mediado por la regulación del conjunto de neuropéptidos hipotalámicos, con una *up-regulation* de AgRP y NPY, y *down-regulation* de POMC en el ARC de ratas hipertiroideas (Pijl et al., 2001) (Ishii et al., 2003; Lopez et al., 2010b; Gonzalez et al., 2012; Varela et al., 2012). La acción de TH ha sido vinculada también a otras dianas en el mismo núcleo como son D2, UCP2 y mTOR (Varela et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2014b). mTOR es una serina-treonina kinasa que modula la progresión del ciclo celular así como el crecimiento celular mediante la detección de cambios que se producen en el balance energético, factores de crecimiento, nutrientes o oxígeno (Martinez de Morentin et al., 2014b; Catania et al., 2011). La ruta de mTOR es altamente expresada en núcleos hipotalámicos específicos como el ARC, donde se colocaliza con NPY, AgRP y POMC (Cota et al., 2006; Martinez de Morentin et al., 2014b). A este nivel, la señalización de mTOR juega un papel crucial en las redes hipotalámicas que responden a la disponibilidad de nutrientes (como la concentración de leucina) y el entorno hormonal (Martinez de Morentin et al., 2014b; Catania et al., 2011).

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

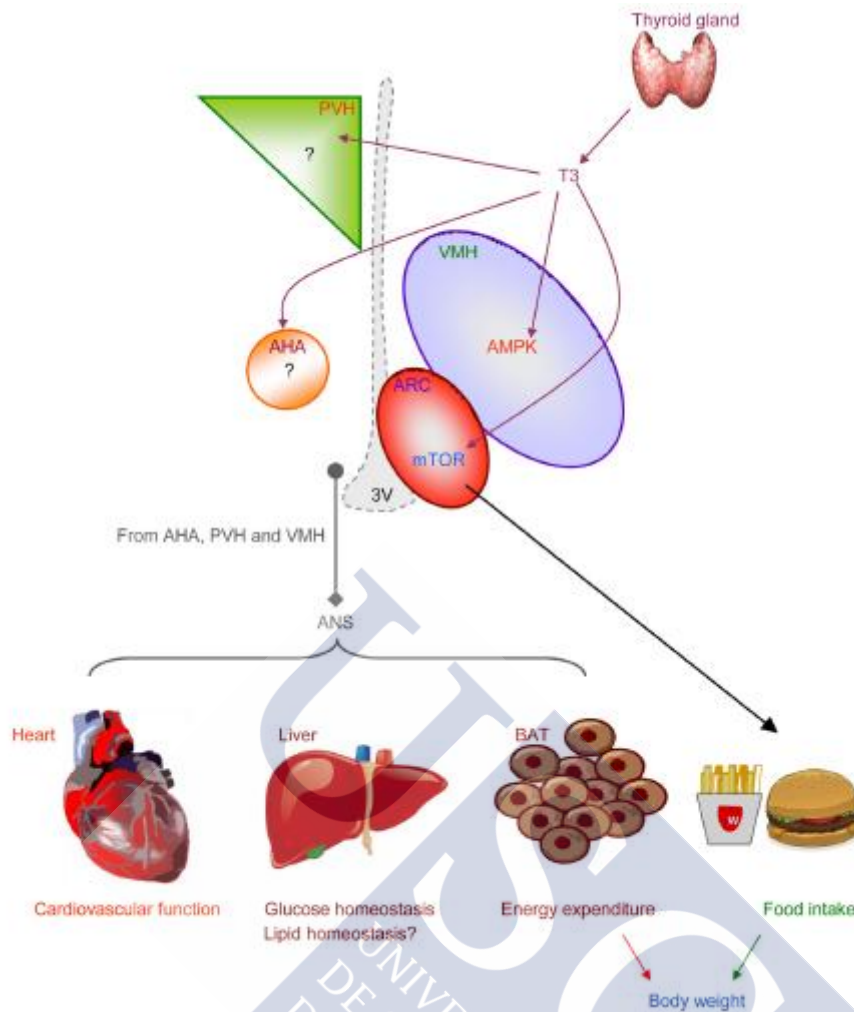
Estas evidencias indican que las acciones de T3 en varios de los sensores metabólicos hipotalámicos son diferentes: la regulación de la ingesta es mediada a través de mTOR en el ARC (Varela et al., 2012), mientras la modulación del balance energético ocurre vía AMPK en el VMH (Lopez et al., 2010b) (**Ilustración 14**).



**Ilustración 14.** *Dianas identificadas de las hormonas tiroideas en el hipotálamo adulto (Warner and Mittag, 2012).*

#### Hormonas tiroideas y metabolismo de la glucosa en el hígado

Kalsbeek y Fliers han demostrado que las THs modulan la producción de glucosa hepática y la sensibilidad a insulina a través de una vía simpática desde el PVH hacia el hígado, independientemente de las hormonas circulantes que regulan la glucosa (Fliers et al., 2010a; Klieverik et al., 2008; Klieverik et al., 2009b). La tirotoxicosis incrementa la producción de glucosa por parte del hígado. La simpatectomía atenúa este incremento en la producción de glucosa hepática durante la tirotoxicosis, mientras la parasimpatectomía no afecta a la producción de glucosa hepática pero disminuye la sensibilidad a insulina (Klieverik et al., 2008). Tras la administración central de T3 en el PVH (núcleo con abundante expresión de TRs) se estimula la producción hepática de glucosa, pero la eliminación de las conexiones simpáticas hacia el hígado elimina este efecto (Klieverik et al., 2009b). Este estudio concluye que la administración central de las THs requiere un SNS intacto para actuar a través del eje PVH-hígado para controlar la producción de glucosa. Dado que el ARC también tiene su función en la modulación de la producción de glucosa hepática (Obici et al., 2002; Konner et al., 2007; Konner et al., 2009) y expresa un gran número de TRs podría tener un potencial relevante para futuras investigaciones sobre la señalización de TH y el metabolismo de la glucosa.



**Ilustración 15.** Modelo representativo de las acciones centrales de las hormonas tiroideas en el metabolismo periférico (Martinez-Sanchez et al., 2014).









Los objetivos de este estudio fueron:

1. Determinar si las hormonas tiroideas actuando a nivel hipotalámico regulan el metabolismo lipídico periférico.
2. Investigar los mecanismos moleculares que median dichos efectos.
3. Investigar si estas acciones son parte de una respuesta coordinada integrada entre la homeostasis lipídica y el balance energético corporal a nivel global.









MODELOS ANIMALES Y CUIDADOS

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron:

- 1) Rata macho común (*Rattus Norvergicus*) de la cepa Sprague-Dawley suministrados por el Animalario General de la Universidad de Santiago de Compostela, con una masa corporal de unos 250 gramos aproximadamente (9-11 semanas).
- 2) Ratón macho adulto (8-10 semanas) de la cepa C57BL6 y ratones macho *knock-out* para el gen *JNK1* (suministrados por la Doctora Guadalupe Sabio, del CNIO-Madrid) {Dong, 1998 1252 /id}{Das, 2009 1253 /id}{Sabio, 2009 1032 /id}.
- 3) Ratón macho adulto (8-10 semanas) de la cepa C57BL6 *knock-out* para el gen *JNK2* y floxeados para el gen *JNK1* (suministrados por la Doctora Guadalupe Sabio, del CNIO-Madrid) {Yang, 1998 1256 /id}{Clausen, 1999 1254 /id}{Das, 2007 1255 /id}{Das, 2009 1253 /id}{Sabio, 2010 1034 /id}.

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

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

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

Todos los procedimientos experimentales y protocolos de manipulación de animales llevados a cabo durante la realización de esta tesis han sido aprobados previamente por el jefe del servicio provincial de ganadería del departamento territorial de la Consellería do Medio Rural e do Mar de la provincia de La Coruña (competente para dictar dicha resolución en base al Decreto 245/2009 del 3 de abril por el que se regulan las delegaciones territoriales da Xunta de Galicia y el Decreto 46/2012 del 19 de enero por el que se establece la estructura orgánica de la Consellería do Medio Rural e do Mar e do Fondo Galego de Garantía Agraria) cuya persona

responsable es Miguel A. López Pérez y realizados bajo los números de procedimientos: ID 15005AE/10/FUN/FISIO2/MLP2 (bajo el cumplimiento del *RD 1201/2005 del 10 de octubre, sobre la protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos*) y el ID 15010/14/006 (bajo el cumplimiento del actual y vigente *RD 53/2013 del 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia*), de acuerdo a la legislación vigente: Ley 30/1992 del 26 de noviembre del régimen jurídico de las administraciones públicas y del procedimiento administrativo común, modificada por la Ley 4/1999, del 14 de enero, por la que se establece que la resolución que proponga fin al procedimiento decidirá todas las cuestiones expuestas por los interesados y aquellas otras derivadas de este; el Decreto 296/2008 del 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el ‘Rexisro de centros de cría’, de suministradores y usuarios y la ‘Comisión Galega de Benestar de los Animales de Experimentación’; orden del 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el ‘Comité de Bioética da Consellería Rural’; Decreto 153/1998 del 2 de abril por lo que se aprueba el reglamento que desarrolla la Ley 1/1993 del 13 de abril (protección de animales domésticos y salvajes en cautividad); Ley 32/2007 del 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte y sacrificio; siguiendo también la Directiva Europea de Experimentación Animal (2010/63/UE).

#### ANESTESIA Y ANALGESIA

Para llevar a cabo los diferentes procedimientos quirúrgicos, los animales fueron tratados con anestesia general mediante una inyección intraperitoneal (IP). La composición de la anestesia fue en el caso de rata de 42,5% de ketamina (*Imalgene 1000 inyectable*, Merial, Barcelona, España), 20% xilazina (*Rompún 2%*, Bayer Health Care, Berlin, Alemania) y 37,5% de suero salino fisiológico (*Suero fisiológico isotónico*, Physan, Madrid, España), y la dosis utilizada fue de 200µl/100 gramos de masa corporal; en el caso de ratón los componentes fueron los mismos pero en distinta proporción (1 ml ketamina, 250 µl de xilazina, 6 ml de salino) y la dosis fue de 100µl/10g de masa corporal (duración de unas 2 horas aproximadamente). Para comprobar el estado de anestesia de cada individuo, se comprobó el reflejo podal y palpebral, de tal forma que su ausencia es indicativo de que puede llevarse a cabo el procedimiento quirúrgico.

Tras los procedimientos quirúrgicos los animales fueron tratados con ketoprofeno como medida de analgesia (*ketoprofeno-Orudis 100 mg.*, Sanoli aventis, Barcelona, España) por vía subcutánea (SC), administrando unos 2,5 mg por Kg de masa corporal.



### VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE SUSTANCIAS

Se han utilizado diferentes vías de administración de sustancias que se describen a continuación, así como las sustancias inyectadas.

#### 1) Vía intraperitoneal (IP)

Esta vía no requiere anestesia; se realiza en la parte ventro-caudal de la rata por debajo del peritoneo. Se coge al animal por la espalda con ayuda de un trapo para poder inmovilizarlo intentando oprimirle las extremidades anteriores. Se inclina la cabeza del animal ligeramente hacia abajo para minimizar el riesgo de desgarro en vísceras y se inserta la aguja (*BD Microlance, 25G 5/8" 0,5x16mm, BD Medical Surgical Systems*) (acoplada a una jeringa (*1 ml BD slip-tip syringe, bulk, non-sterile, BD Medical Surgical Systems*)) prácticamente de manera perpendicular a este, preferiblemente por su costado derecho. Esta vía fue utilizada para la administración de la anestesia (dosis detallada en la sección anterior) y para la administración de T3.

Sustancias IP	Casa Comercial	Dosis	Vehículo
T3	SIGMA; St. Louis, MO, USA	4 ng / día	Salino:DMSO (1:50)

#### 2) Vía subcutánea (SC)

No requiere anestesia y se realiza por la zona lateral dorso-caudal del animal, por encima de la pata posterior. Se inmoviliza el animal con la ayuda de un trapo cubriéndole la cabeza, se pellizca el lomo del animal con la misma mano; con la otra mano se introduce la aguja, paralelamente a la columna vertebral. Este procedimiento puede ser llevado a cabo durante varios días seguidos.

Sustancias subcutáneas	Casa Comercial	Dosis	Vehículo
T4	SIGMA; St. Louis, MO, USA	100 µg/día	Salino
SR 59230A	Tocris; Bioscience, Bristol, UK	3 mg/kg/día	DMSO

### 3) Vía intracerebroventricular (ICV)

Tampoco es necesaria anestesia en este procedimiento, el animal está totalmente consciente. Con ayuda de un trapo se inmoviliza de forma leve al animal presionándolo suavemente contra la base de su jaula intentando evitarle un excesivo estrés; se abre la cánula implantada con ayuda de una tijera por el extremo sellado, se introduce una jeringuilla Hamilton (*Model 7001KH 25s, Hamilton*) y se produce a su vaciado una vez que está correctamente insertado. Al retirar la aguja es necesario extremar el cuidado sujetando la cánula para evitar su desplazamiento del lugar de inserción. Este procedimiento se repite en el mismo individuo durante varios días consecutivos, pero nunca más de 8-10 días desde la implantación de la cánula.

Estas cánulas pueden conectarse a bombas osmóticas que contengan la sustancia de interés y que se colocaron en el espacio interescapular del animal bombas osmóticas (*modelo 2001, Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA*) que nos permite un flujo constante de la sustancia inoculada a un ritmo según indica el fabricante (0,5ul/hora aproximadamente) durante 6-7días (explicado más adelante).

Sustancias ICV	Casa Comercial	Dosis	Vehículo
T3 (crónico) (rata)	SIGMA; St. Louis, MO, USA	4 ng /4µl / día	Salino:DMSO (1:50)
T3 (crónico) (ratón)	SIGMA; St. Louis, MO, USA	8 ng /1µl / día	Salino:DMSO (1:50)
T3 (agudo)	SIGMA; St. Louis, MO, USA	16 ng /1 µl	Salino:DMSO (1:50)
Ceramidas	SIGMA; St. Louis, MO, USA	1,25 mg/ml	Salino:DMSO (1:3)
SP 600125	Tocris; Bioscience, Bristol, UK	0,5 µg/µl	Salino;DMSO (1:50)
Rottlerin	Calbiochem; Billerica, USA	60 µmoles/L	Salino;DMSO (1:50)

### 4) Vía núcleo-específica

Para esta vía se requiere anestesia general. Se utiliza para poder acceder a núcleos concretos del cerebro del animal; se requieren coordenadas concretas seleccionadas previamente del Atlas Paxinos (tanto para rata como ratón). Para ello pueden usarse dos métodos:

- a. Mediante la utilización de un aparato de estereotaxia (*KOPF, David Kopf Instruments*) (ver en más detalle en **Procedimientos quirúrgicos**) y jeringuillas de microinyección (*Hamilton, Serie 700, modelo 7001, 1µl calibre 25 para rata y Hamilton, NeuroHamilton Modelo 7001KH Neuros Syringe, en el caso de*

ratón), con un flujo de inyección de 200 nl/min durante 5 minutos en el caso de ratas y 10-15 minutos en el caso de ratón.

- b. Mediante la utilización de cánulas bilaterales nucleoespecíficas (*Plastics One*, Roanake, VA USA); se insertan en el cerebro en unas coordenadas específicas con la ayuda del estereotáxico. Estas cánulas van conectadas a mini bombas osmóticas (*modelo 10007D, Alzet Osmotic Pumps*, Cupertino, CA, USA) que nos permite un flujo constante de la sustancia inoculada a un ritmo según indica el fabricante (0,5ul/hora aproximadamente) durante 6-7días.

Sustancias estereotaxia	Casa Comercial	Concentración	Vehículo
Ad-AMPK-CA	<i>Viraquest</i> ; North Liberty, IA, USA	$1 \times 10^{12}$ pfu/ml (1:50)	PBS
Ad-AMPK-DN	<i>Viraquest</i> ; North Liberty, IA, USA	$1,12 \times 10^{12}$ VG/ml	PBS
Ad-TR-DN	<i>Viraquest</i> ; North Liberty, IA, USA	$1 \times 10^{12}$ pfu/ml	PBS
Ad-GRP78-DN	<i>Viraquest</i> ; North Liberty, IA, USA	$1 \times 10^8$ pfu/ml	PBS
Ad-Cre	<i>SignaGen</i> ; Rockville, MD, USA	$1,12 \times 10^{12}$ VG/ml	PBS

### PROCEDIMIENTOS NO QUIRÚRGICOS

**Monitorización de la ingesta y de la masa corporal:** la determinación de la masa corporal y de la ingesta se realizó mediante una balanza de precisión; los animales fueron pesados diariamente así como su comida, siempre más o menos a la misma hora en cada experimento (aproximadamente cercano a la hora de inicio de la fase oscura). En el caso en que los animales fueron mantenidos en grupo en una misma caja (en el caso de las hipertiroideas y durante el período de acción del adenovirus Cre), la ingesta se promedió en función del número de individuos de cada caja.

**Determinación de la composición corporal:** el análisis de la composición corporal se hizo a través de una técnica de resonancia magnética de imagen (*Whole Body Composition Analyzer EhcoMRI 500, EchoMRI*, Houston, Texas, USA); con ella se obtuvieron datos de la composición de masa grasa, masa magra y agua de cada animal. Las determinaciones se hicieron al inicio y al final del experimento.

**Preparación de mini bombas osmóticas:** para la administración crónica de sustancias en núcleos específicos del hipotálamo se utilizaron bombas osmóticas (*modelo 1007D, Alzet Osmotic Pumps*, Cupertino, CA, USA). Antes de la implantación en el animal, las bombas fueron rellenas con las sustancias a inocular o con su correspondiente vehículo; posteriormente se les colocó un catéter en la zona de expulsión (para la posterior conexión con

las cánulas nucleoespecíficas). Luego se colocaron en un baño a 37°C durante toda la noche, o bien mínimo 6 horas, para que se activaran y comenzaran a expulsar la sustancia.



## PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS

### Canulación ICV

Se llevó a cabo este procedimiento en todos aquellos experimentos que requerían la administración de sustancias a nivel central, directamente en el cerebro, en el ventrículo lateral. Las cánulas usadas para este efecto, consistían en un tubo de polietileno (*BD Intradermic® Polyethylene tubing (Non-Sterile)*, Becton Dickison and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) (*PE-20* en el caso de ratas; *PE-50* en el caso de ratón) de 1,09 mm de diámetro exterior, 0,38 mm de diámetro interior, y de 0,965 mm de diámetro exterior, 0,58 mm de diámetro interior para ratón. Se cortó uno de los extremos en forma de bisel con un ángulo de 45° y con una longitud de 0,5 mm; a 4 mm de este bisel, en el caso de rata, y a 2,5 mm en el caso de ratón se insertó un tope. La longitud total de la cánula para rata es de 3,5mm y 2,5 mm para ratón. El otro extremo se selló hasta el momento de la administración del tratamiento.



Una vez anestesiados los animales y comprobado su estado de anestesia, se les practicó un corte transversal en la piel de la cabeza (por delante de las orejas) perpendicular a la sutura

sagital de aproximadamente 1,5cm. Con ayuda de un mosquito se mantuvo la piel retirada para tener una óptima visión del plano quirúrgico. Posteriormente se separó el tejido subcutáneo del cráneo dejando al descubierto la inserción entre la sutura sagital y la sutura coronal, es decir, el bregma; si se producía sangrado se presionó el cráneo con una gasa durante unos segundos hasta el cese de dicho sangrado. Tras la correcta localización del bregma, se realizó una perforación en el cráneo (al lado derecho o izquierdo del bregma) con una broca quirúrgica a una distancia lateral de 1,5 mm de la sutura sagital y 0,9 mm posterior al bregma (en el caso de rata) y una distancia lateral de 1,2 mm de la sutura sagital y 0,6 mm posterior al bregma (en el caso de ratón). Tras reducir el eventual sangrado con una gasa, se introdujo la cánula en el orificio por el extremo biselado, de manera paralela al eje dorso-ventral del animal. Finalmente, la cánula se fijó al cráneo del animal con el adhesivo cianocrilato (*SuperGlue-3, Loctite*). Tras la canulación los animales se estabularon individualmente y se dejó un periodo de recuperación de entre 3-4 días antes de proceder a la inyección de las sustancias.

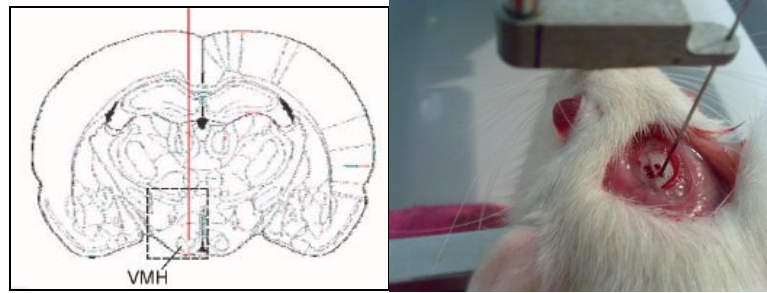
#### **Estereotaxia núcleo-específica**

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

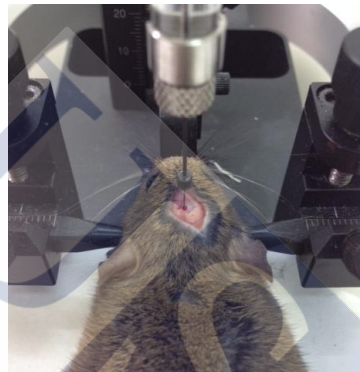
Tras la anestesia general de los animales se les realizó un corte transversal en la piel de la cabeza por detrás de las orejas. Se retiró la piel con ayuda de un mosquito para mantener visible el plano quirúrgico y se les separó el tejido subcutáneo del cráneo dejando al descubierto la zona circundante al bregma. Posteriormente se marcó el bregma para tomarlo como punto de referencia para la posterior localización de las coordenadas y se colocó al animal en un instrumento de estereotaxia (*David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA*).

Una vez fijada la rata en el aparato se anotaron las coordenadas de referencia correspondientes al punto bregma. A partir de ahí:

- En el caso de rata: en el VMH se realizaron dos inyecciones en cada hemisferio cerebral siguiendo las siguientes coordenadas: eje antero-posterior: 2,4-3,2 mm; eje lateral: 0,6 mm; eje dorso-ventral: 10,1 mm. En el caso del ARC se realizó una inyección en cada hemisferio cerebral siguiendo las siguientes coordenadas: eje antero-posterior: 2,8 mm; eje lateral: 0,3 mm; eje dorso-ventral: 10,2 mm.



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



Posteriormente, se perforó el cráneo en cada punto de las coordenadas con una broca quirúrgica y se procedió a la inyección de la sustancia. En cada inyección se inoculó 1µl de sustancia durante 5 minutos para el caso de ratas y 10-15 minutos para el caso de ratones (velocidad de administración: 200nl/min).

Una vez terminada la inoculación se procedió a la sutura del corte en la piel mediante la ayuda de seda de sutura (*Ethicon Mersilk Soie, Special 2-0, Johnson and Johnson company, Alemania*) y se estabularon los animales de forma individual.

Para la administración crónica de sustancias en núcleos específicos del hipotálamo se utilizaron cánulas bilaterales permanentes (*Plastics One, Roanake, VA USA*) de diferentes características de longitud y separación entre los inyectores de cada hemisferio, según el núcleo acorde a las coordenadas señaladas anteriormente:

- Para VMH: eje antero-posterior: 2,8 mm; eje lateral: 0,6 mm; eje dorso-ventral: 10,1 mm.
- Para ARC: eje antero-posterior: 2,8 mm; eje lateral: 0,3 mm; eje dorso-ventral: 10,2 mm.

Se perforó el cráneo en cada punto de coordenadas con una broca quirúrgica y se introdujo la cánula, de manera paralela al eje dorso-ventral del animal. A continuación se fijó la cánula al cráneo con adhesivo cianocrilato (*SuperGlue-3, Loctite*, Barcelona, España); cada inyector se conectó a una mini bomba osmótica (modelo 1007D, *Alzet Osmotic Pumps*, Cupertino, CA, USA) mediante un catéter. Finalmente se colocaron las mini bombas osmóticas en la zona lumbar, debajo de la piel, y se cerró el corte con seda de sutura.

Al final del procedimiento los animales se estabularon individualmente.

### **Registro de la actividad simpática**

El registro multi-fibras de actividad del nervio simpático (SNA) fue obtenido mediante el registro de los nervios que inervan BAT

Una vez anestesiados los animales del modo previamente descrito, se les mantuvo bajo anestesia mediante el uso de  $\alpha$ -cloralosa (dosis inicial: 25mg/kg, dosis repetidas: 50 mg/kg/h) administrada vía catéter en la vena femoral. Se les practicó una traqueotomía para permitir la correcta respiración y se monitorizó y mantuvo la temperatura rectal a 37.5°C usando una mesa quirúrgica de temperatura controlada y una lámpara. Se identificó e inervó una fibra nerviosa interescapular en el BAT usando un microscopio de disección y se colocó sobre un electrodo bipolar de platino-iridio unido a una sonda de alta impedancia (*HIP-511, Grass Instruments; West Warwick, RI USA*). La señal se amplificó 105 veces con la ayuda de un preamplificador (*Grass P5 AC*). Tras la amplificación, se filtró la señal a 100 y 1000 Hz. A continuación, la señal del nervio se acopló a un osciloscopio (*54501A, Hewlett-ackard, Iowa, USA*) para monitorizar la calidad del registro del nervio. Las medidas de actividad del SNS en el BAT se realizaron cada 15 minutos durante 6 horas tras las inyecciones ICV. Para asegurar que el ruido eléctrico era excluido durante el estudio, cada registro se corrigió por la actividad del nervio post-mortem. (Protocolo experimental realizado por el Dr. Kamal Rahmouni, Departments of Internal Medicine, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa, 52242, USA).

### **Vagotomía**

Los animales sometidos a este procedimiento fueron puestos en ayuno la noche previa a la operación, así evitábamos que el estómago estuviera hinchado y fue más fácil el acceso a él. Las ratas fueron anestesiadas como hemos descrito previamente; se colocan sobre su espalda en posición decúbito dorsal y se hace una incisión en la línea media abdominal. Se visualizó el

estómago y el hígado es movido cuidadosamente para poder visualizar bien el esófago. Las dos ramas del nervio vago (dorsal y ventral) fueron expuestas y diseccionadas a la altura del esófago justo por encima del estómago. Cada rama del nervio fue ligado previamente con seda de sutura en ambos extremos más distales para prevenir el desangrado. Luego los músculos abdominales y la piel fueron cosidos con seda de sutura.

También se hicieron ratas control o *sham*, a las cuales solo se les provocó una incisión abdominal igual que las anteriores, y las ramas del nervio vago fueron expuestas pero no se les realizó ninguna sutura.

Luego las ratas fueron estabuladas y se estableció un tiempo de recuperación de unos 15 días antes de someterlas al siguiente procedimiento.

La efectividad de la vagotomía fue confirmada al final del experimento, una vez *post-mortem* mediante el análisis del estómago; solo las ratas que mostraban un incremento evidente en el tamaño del estómago después de la vagotomía (debido a la disminución en la movilización gástrica) fueron incluidas en el análisis.

### **Perfusión intracardíaca**

El cerebro de la rata se fija mediante perfusión intracardíaca como paso previo al estudio inmunohistoquímico. Tras la anestesia general del animal con el anestésico habitual se coloca el animal en posición decúbito dorsal y se procede a la apertura de la cavidad abdominal. Tras la localización del apéndice xifoides, este se levanta ligeramente con unas pinzas procediendo a la rotura del diafragma y al corte de las parrillas costales. Tras la apertura de la caja torácica y del pericardio, se administraron en una inyección intracardíaca 200 µl de heparina (*Heparina sódica Mayne 5%; Mayne Pharma*) en el ventrículo izquierdo, con el fin de evitar problemas de coagulación en los vasos durante la perfusión.

A continuación, se realiza una pequeña incisión en la punta del ventrículo izquierdo por la cual se introduce una cánula hasta llegar a la raíz de la aorta. Tras el clampaje de la vía se secciona la orejuela de la aurícula derecha. A través de dicha vía se bombea una solución de suero salino 0.9% NaCl, con el fin de eliminar la sangre del sistema circulatorio. La decoloración del hígado, así como la de la propia solución salina que sale por la orejuela seccionada marca el inicio del proceso de fijado. A través de la misma vía se introducen 500 ml de una solución de formalina (100mM) en tampón fosfato (PB, pH=7.4) durante aproximadamente 10 minutos. La eficacia de la perfusión puede constatarse por la rigidez plena



del animal. Los tejidos son diseccionados y mantenidos en la solución de fijado durante 12 horas a 4°C. A continuación se realizan un par de lavados en tampón fosfato.

### **Infusión de oleato-C<sup>14</sup>**

Las ratas previamente operadas para la inserción de cánulas ICV fueron sometidas a un periodo de recuperación de 7 días antes de las infusiones. Las ratas previamente anestesiadas con una solución de alfa-cloralosa (solución 2,5%; 50 mg / kg) se colocaron sobre almohadillas de calor antes de insertar un catéter en la vena femoral. La anestesia fue infundida simultáneamente (25 mg / kg / h) junto con el trazador oleato-C<sup>14</sup> (3.000 Bq / minuto, dosis total: 0,6 MBq en 0,3 μmol de oleato) (Duivenvoorden et al., 2005). Después de 30 min de la línea de base, se tomaron mediciones de suero y las ratas tratadas con vehículo (DMSO) o T3 (4 ng durante 3 horas (se disolvió en 5 μL de DMSO; Sigma, St Louis, MO, EE.UU.) a través de las cánulas ICV. Las muestras de sangre se tomaron a intervalos regulares hasta que se terminó el experimento; se sacrificaron los animales y se produjo la recolección de tejidos

Para el análisis de la actividad específica del C<sup>14</sup> los tejidos y sueros lisados o los extractos de lípidos se resuspendieron en el reactivo *Beta-Flour Scintillans* (National Diagnostics; Atlanta; USA) y las desintegraciones por minuto fueron medidas usando un contador de centelleo (*LabLogic 300SL, LabLogic*; Broomhill, UK).

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

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

## **DISEÑOS EXPERIMENTALES**

### **Alteración del estado tiroideo**

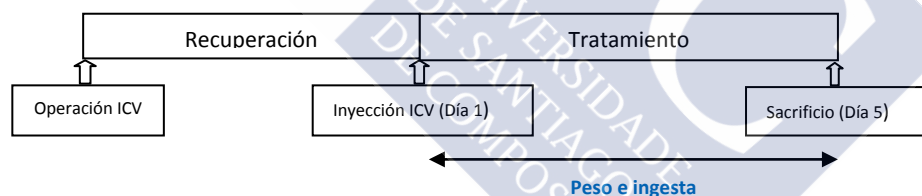
Gran parte de los diseños experimentales se realizan con ratas con el estado tiroideo alterado. Para la generación de estos modelos se somete a los animales a tratamientos de 21 días

en los que se les indujo el hipertiroidismo; para ello se inyectó a las ratas mediante administración subcutánea, L-tiroxina (Sigma; ref.T2501) (100 µg/rata/día, disuelta en suero salino, en un volumen de 200 µl) durante 21 días. A los animales control (eutiroideos) se les suministró la misma cantidad, subcutánea, de vehículo (salino). La dosis utilizada se basó en estudios previos (Lopez et al., 2010b; Gonzalez et al., 2012; Varela et al., 2012).

Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas en grupos de 4-5 animales por caja; el tratamiento se inició antes de la fase nocturna y se realizó durante los 21 días aproximadamente a la misma hora; en ese mismo momento, se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente.

### **Tratamiento ICV crónico y agudo con T3**

Para este tratamiento, antes de la inserción de la sustancia, como se explicó más arriba, a las ratas se les insertó una cánula ICV y estuvieron en un periodo de recuperación de unos 4 días. Una vez pasado ese tiempo, se procedió a la inyección de T3 (4 ng/rata/día en un volumen de 5 µl de salino) durante 5 días consecutivos, siempre antes del inicio de la fase oscura (fase activa del roedor), todos los días a la misma hora aproximadamente. El 5º día, el día del sacrificio, se procedió al pinchazo correspondiente y se esperó unas 2-3 horas antes del sacrificio.



En el caso del tratamiento agudo a 3 horas, se procedió de igual manera, pero en este caso se inyectó la sustancia y a las 3 horas se produjo el sacrificio del animal.

Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; en el mismo momento del pinchazo se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente.

### **Tratamiento ICV crónico con T3 en ratas vagotomizadas**

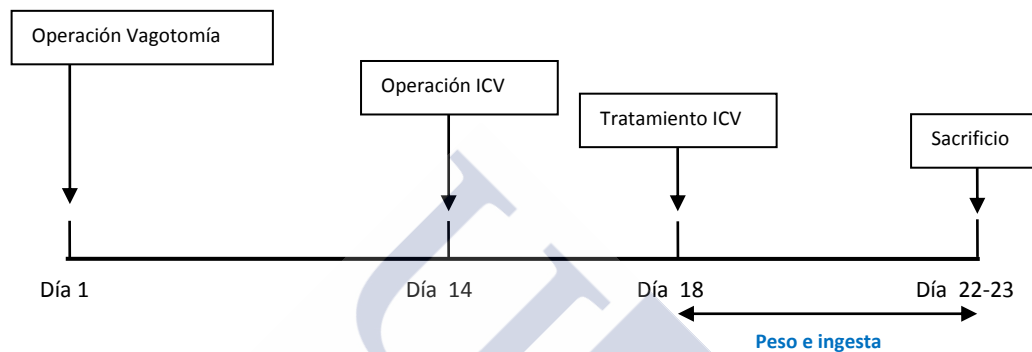
En este tratamiento, las ratas fueron vagotomizadas, como se describió arriba. Durante su período de recuperación, sobre el día 14-15 se procedió a la segunda operación para la inserción de la cánula ICV. Se dejaron recuperar igualmente los días correspondientes a una operación

ICV (4 días) y luego se llevó a cabo la administración de T3 de igual forma que se detalla en el apartado de tratamiento ICV con T3.

Se organizó en cuatro grupos:

-*Sham*-vehículo ICV / *Sham*-T3 ICV

-Vagotomía-vehículo ICV / Vagotomía-T3 ICV



Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas en cajas de 4-5 ratas durante la recuperación de la vagotomía y posterior a la operación ICV fueron estabuladas individualmente. En el mismo momento del tratamiento antes de la fase oscura se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente.

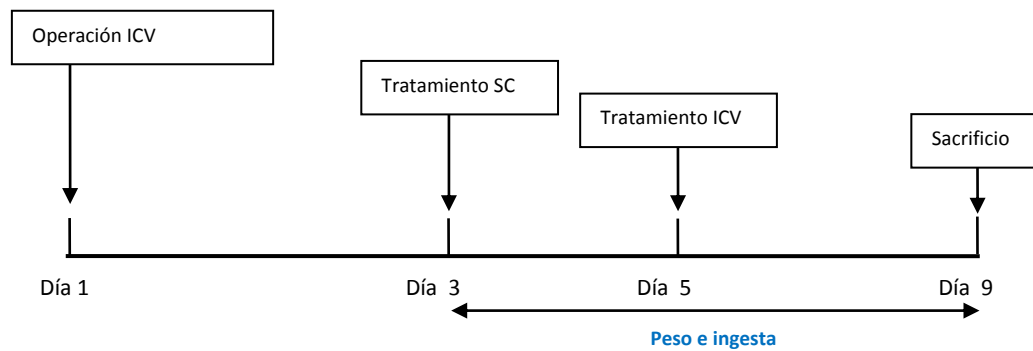
#### **Tratamiento ICV crónico con T3 y antagonista $\beta$ 3-AR (SR59230A) subcutáneo**

Este tratamiento se hizo en ratas a las que se les insertó la cánula de igual forma que mencionamos anteriormente. En este caso, antes de la finalización del periodo de recuperación, dos días antes de la administración de T3, se comenzó con la inoculación del antagonista a nivel SC, inyectado dos veces al día (la dosis diaria dividida en dos periodos de administración, uno a primera hora de la mañana y otro a última hora de la tarde). Al cuarto día de recuperación de la operación ICV, se comenzó con el tratamiento ICV de T3 y se continuó igualmente con el tratamiento SC, así, con los dos tratamientos, hasta el día 5 cuando se produjo el sacrificio de los animales.

Se establecieron cuatro grupos:

-Vehículo SC-Vehículo ICV / Vehículo SC -T3 ICV

- SR59230A SC -Vehículo ICV / SR59230A SC-T3 ICV



Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; en el mismo momento del pinchazo se procedió al pesado del animal y de la ingesta.

### **Tratamiento IP crónico con T3**

En este caso, las ratas fueron tratadas con T3 pero a nivel IP. Se usó la misma dosis usada en la administración ICV disuelta en 200  $\mu$ l de salino (1:50; DMSO:salino) durante 5 días, administrada a la misma hora que el tratamiento ICV.

Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; en el mismo momento del pinchazo se procedió al pesado del animal y de la ingesta.

### **Tratamiento núcleo-específico crónico de T3 mediante bombas**

Para este tratamiento las ratas fueron sometidas a estereotaxia para la inserción de las cánulas núcleo-específicas (VMH y ARC) que iban conectadas a dos minibombas osmóticas que portaban la T3 (4 ng/día; con un flujo de 0.5  $\mu$ l/hora durante 6 días).

Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; se procedió al pesado del animal y de la ingesta una vez al día siempre a la misma hora. Estos animales fueron sometidos a NMR antes del inicio del tratamiento y el último día de tratamiento.

### **Tratamiento de T3 en regiones cercanas al VMH**

En este caso, las ratas fueron sometidas a inyecciones de T3 (dos en cada hemisferio) con coordenadas aleatorias pero próximas a regiones circulares al VMH. Tras esta administración se esperaron unas 3 horas y se produjo el sacrificio de los animales.

### **Inoculación estereotáxica de Ad-TR-DN, Ad-AMPK-CA y Ad-AMPK-DN en el VMH**

Se realizaron tres experimentos distintos con cada adenovirus; en todos se hicieron dos grupos (GFP y Adenovirus). Se les realizó a las ratas una inoculación estereotáxica de adenovirus (Ad) en el VMH (como se describió previamente). El vehículo utilizado para todas las inoculaciones fue PBS 0,5 %.

- GFP y Ad-AMPK-CA: a estos individuos se les inoculó 1  $\mu$ l ( $1 \times 10^{12}$  pfu/ml; 1:50) de una solución de adenovirus constitutivamente activos capaces de sobre-exresar las isoformas  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de la proteína AMPK (AMPK $\alpha 1\alpha 2$ -CA (1:1)) (*Viraquest*, North Liberty, IA, USA). Además estos virus expresaban también la proteína GFP (*green fluorescent protein*). Al otro grupo, que se utilizó como control, se les inoculó 1  $\mu$ l ( $1 \times 10^{12}$  pfu/ml) (1:50), expresaban solamente GFP.
- GFP y Ad-AMPK-DN: el adenovirus administrado es una mezcla de las mismas cantidades de dominantes negativos para AMPK $\alpha 1$  y AMPK $\alpha 2$  (ambos adenovirus también expresan GFP) (1:1). La dosis administrada de AMPK $\alpha$ -DN (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) estaba a una concentración de, para ambos dominantes negativos,  $1.2 \times 10^{12}$  pfu/ml. Al otro grupo, que se utilizó como control, se les inoculó 1  $\mu$ l ( $1 \times 10^{12}$  pfu/ml) (1:50), expresaban solamente GFP.
- GFP y Ad-TR-DN: la dosis administrada de este adenovirus TR-DN (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) es de 1  $\mu$ l por inyección de un stock de  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml. Como control del tratamiento se administró un adenovirus que expresaba solamente GFP.

Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; se procedió al pesado del animal y de la ingesta diariamente.

### **Inoculación estereotáxica de Ad-AMPK-CA en ratas hipertiroideas**

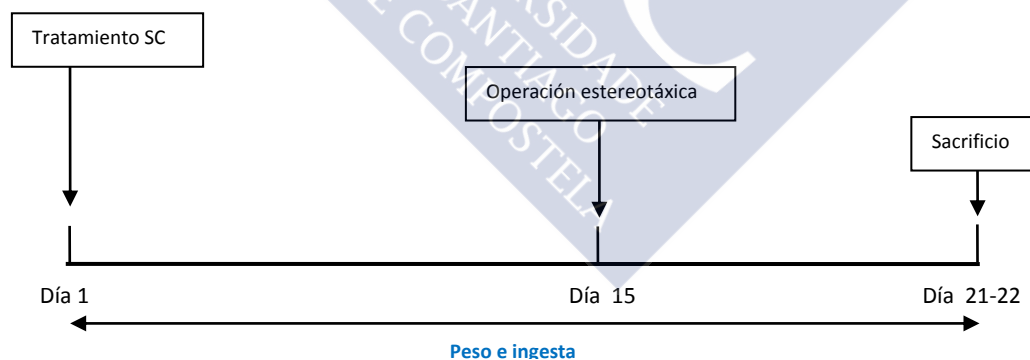
Para este experimento es necesario crear 4 grupos experimentales diferentes.

- Eutiroideas-GFP / Eutiroideas-AMPK $\alpha$ -CA
- Hipertiroideas-GFP / Hipertiroideas-AMPK $\alpha$ -CA

Previamente al tratamiento con adenovirus, se induce la alteración del estado tiroideo, inducción del hipertiroidismo.

El vector adenoviral administrado aparte de expresar la isoforma AMPK $\alpha$ -CA, expresa el cDNA de GFP, que servirá de marcador para poder ver la efectividad de la infección en el núcleo. La dosis administrada de este adenovirus AMPK $\alpha$ -CA (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) es de 1  $\mu$ l por inyección de un stock de  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml; diluido 1:50. Como control del tratamiento se administró un adenovirus que únicamente expresa GFP (1  $\mu$ l por inyección de un stock de  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml) (1:50).

Sobre el día 15 del tratamiento con T4, se procede a la inoculación estereotáxica del adenovirus, dejándolo unos 5-7 días que es cuando el virus tiene su pico de mayor efecto (día 20-22 del tratamiento con T4). Durante todos estos días se continúa con la administración subcutánea de T4.



Las ratas durante este procedimiento fueron establecidas individualmente una vez inoculado el adenovirus; en el mismo momento del pinchazo se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días.

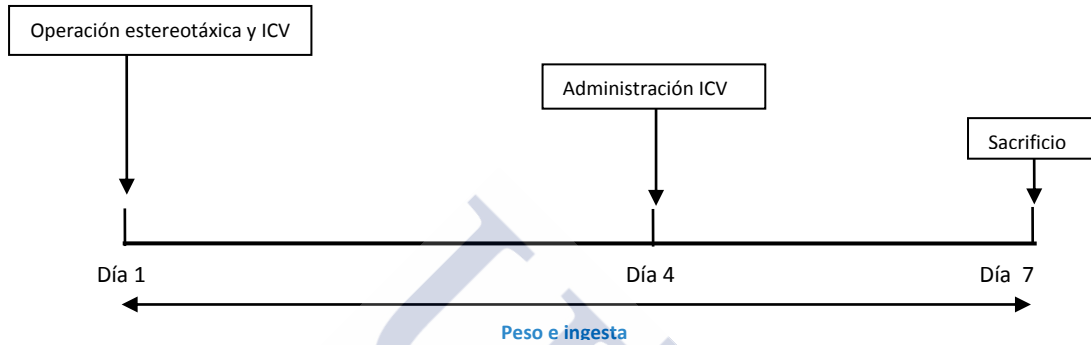
### **Inoculación estereotáxica de Ad-AMPK-CA en ratas tratadas con T3 ICV**

Para este experimento es necesario crear 4 grupos experimentales diferentes.

- Vehículo ICV-GFP / Vehículo ICV-AMPK $\alpha$ -CA

- T3 ICV-GFP / T3 ICV-AMPK $\alpha$ -CA

Se procede a la operación ICV y a la inoculación del adenovirus en la misma operación y el mismo día. En este caso el periodo de recuperación de la ICV se disminuye a tres días, y en ese día se comienza con el tratamiento crónico ICV de T3 para que así coincida durante los días de máximo efecto del virus (5-7 días) ambos tratamientos.



Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; en el mismo momento del pinchazo se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días.

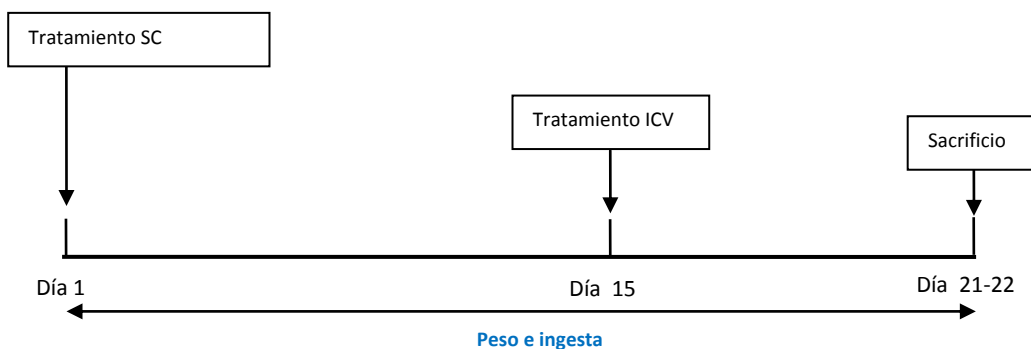
### Tratamiento ICV de ceramidas en ratas hipertiroideas.

Se generan ratas hipertiroideas como se describió anteriormente; sobre el día 15 de su tratamiento SC con T4 se procedió a la inserción de cánulas ICV conectadas a una bomba osmótica que contenía ceramidas. Se administró este tratamiento durante 7 días, al mismo tiempo se continuó con la administración SC de T4, hasta el final del experimento.

Se generan 4 grupos:

-Eutiroideas-Vehículo ICV / Eutiroideas-Ceramidas ICV

-Hipertiroideas-Vehículo ICV / Hipertiroideas-Ceramidas ICV

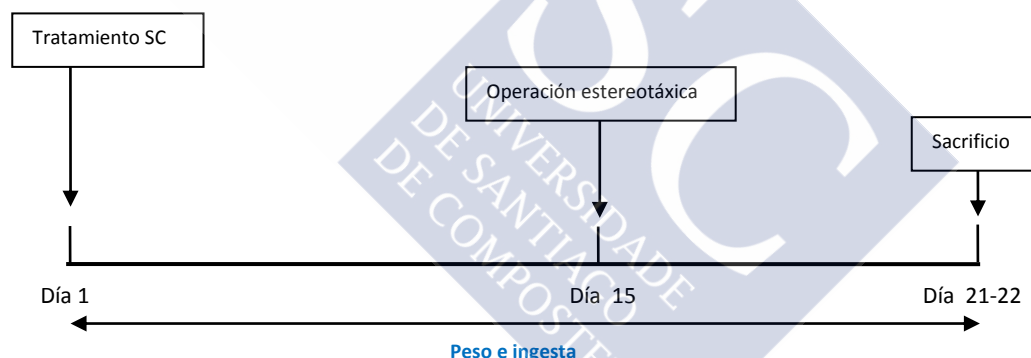


Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente una vez colocada la cánula ICV. Se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días.

### **Inoculación estereotáxica de Ad-GRP78-DN en ratas hipertiroideas**

Previamente al tratamiento con adenovirus, se induce la alteración del estado tiroideo, inducción del hipertiroidismo. El vector adenoviral administrado GRP78-DN (*Viraquest*; North Liberty, IA, USA) expresa una forma inactiva de la proteína GRP78; se inocula 1  $\mu$ l por inyección con una concentración de  $1 \times 10^8$  pfu/ml. Como control del tratamiento se administró un adenovirus que únicamente expresa GFP (1  $\mu$ l por inyección de un stock de  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml) (1:50).

Sobre el día 15 del tratamiento con T4, se procede a la inoculación estereotáxica del adenovirus, dejándolo unos 5-7 días que es cuando el virus tiene su pico de mayor efecto (día 20-22 del tratamiento con T4). Durante todos estos días se continúa con la administración subcutánea de T4.



Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente una vez inoculado el adenovirus; en el mismo momento del pinchazo se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días.

### **Tratamiento ICV de Rottlerin (inhibidor de PKC) en ratas hipertiroideas.**

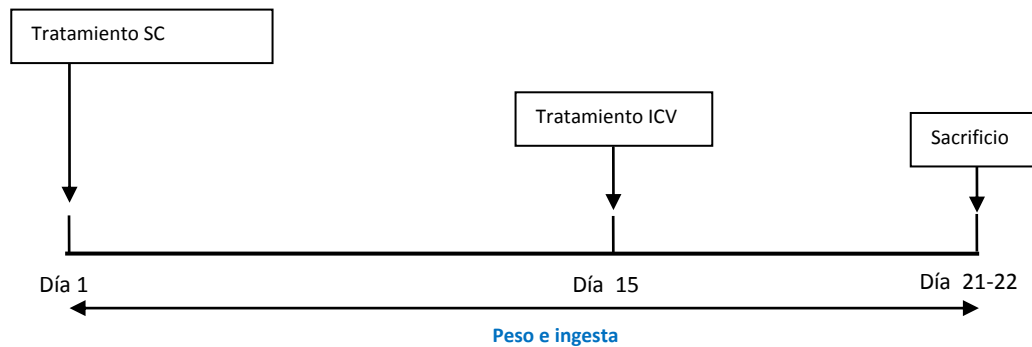
Se generan ratas hipertiroideas como se describió anteriormente; sobre el día 15 de su tratamiento SC con T4 se procedió a la inserción de cánulas ICV conectadas a una bomba osmótica que contenía Rottlerin. Se administró este tratamiento durante 7 días, al mismo tiempo se continuó con la administración SC de T4, hasta el final del experimento.

Se generan 4 grupos:



-Eutiroideas-Vehículo ICV / Eutiroideas-Rottlerin ICV

-Hipertiroideas-Vehículo ICV / Hipertiroideas-Rottlerin ICV



Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente una vez colocada la cánula ICV. Se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días.

#### **Tratamiento ICV de SP600125 (inhibidor de JNK) o de Rottlerin (inhibidor de PKC) en ratas tratadas con T3 ICV**

Para este experimento es necesario crear 4 grupos experimentales diferentes.

- Vehículo ICV-Vehículo ICV / Vehículo ICV-SP600125 ICV (o Rottlerin ICV)
- T3 ICV-Vehículo ICV / T3 ICV-SP600125 ICV (o Rottlerin ICV)

Se procede a la operación ICV y a la conexión de una bomba osmótica a dicha cánula ICV; en esta bomba osmótica iban las dos sustancias administradas (inhibidor+T3; igual medio de dilución). En este caso el periodo de recuperación de la ICV ya va solapado al inicio de la administración de las sustancias.

Las ratas durante este procedimiento fueron estabuladas individualmente; se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días sobre la misma hora.

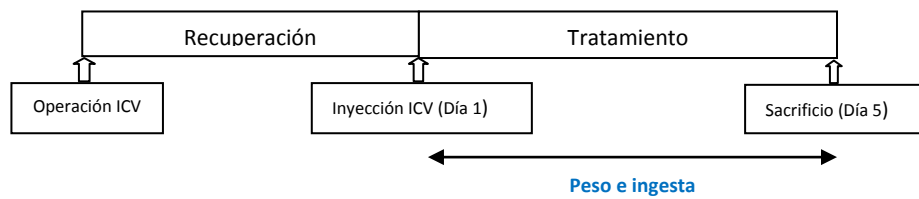
#### **Tratamiento ICV con T3 en ratones WT y JNK1KO**

En este caso se sigue el mismo proceso que en el caso de las ratas; se sometió a la operación para la inserción de las cánulas a los ratones, se les dejó un período de recuperación de 4 días y luego se llevó a cabo la administración de la sustancia a través de la cánula ICV.

Se establecieron 4 grupos:

-WT-Vehículo ICV / WT- T3 ICV

-JNK1KO-Vehículo ICV / JNK1KO- T3 ICV



Los ratones durante este procedimiento fueron estabulados individualmente; se procedió al pesado del animal y de la ingesta todos los días sobre la misma hora al mismo tiempo que se realizó la administración de T3.

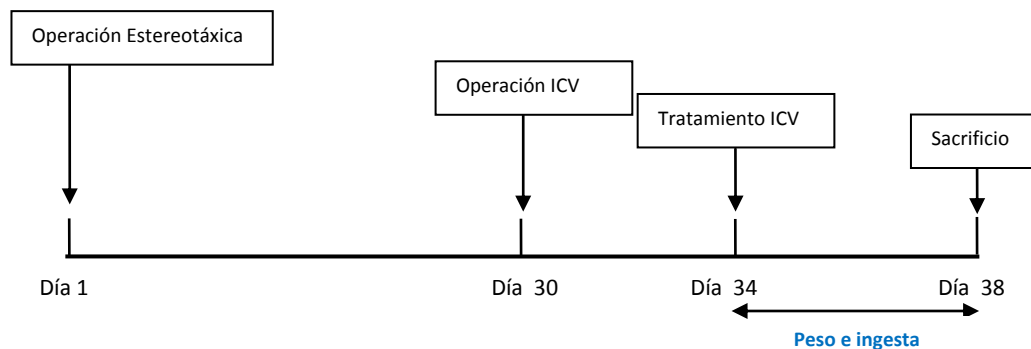
**Inoculación de Ad-Cre en ratones JNK2KO-*jnk1* floxed y posterior administración de T3 ICV.**

Los ratones fueron sometidos a estereotaxia en el VMH con adenovirus adenoasociado Cre (*SignaGen*; Rockville, MD, USA); se inoculó un 1  $\mu$ l por pinchazo en cada hemisferio con una concentración  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml. Como control del tratamiento se administró un adenovirus que únicamente expresa GFP (1  $\mu$ l por inyección de un stock de  $1 \times 10^{12}$  pfu/ml). Se dejó actuar este virus aproximadamente 30 días; una vez pasado este tiempo los ratones fueron sometidos a una segunda operación para la inserción de la cánulas ICV; se dejaron recuperar durante 4 días y luego se llevo a cabo la administración de T3 durante los 5 días.

Se establecieron 4 grupos:

-JNK2KO-*jnk1* floxed-GFP- Vehículo ICV / JNK2KO-*jnk1* floxed-GFP- T3 ICV

- JNK2KO-*jnk1* floxed-Cre- Vehículo ICV / JNK2KO-*jnk1* floxed-Cre- T3 ICV



Los ratones durante este procedimiento fueron estabulados individualmente una vez insertada la cánula ICV. Se procedió al pesado del animal y de la ingesta dos veces a la semana durante el período de espera de actuación del adeno CRE (para evitar el estrés innecesario del animal) y luego todos los días una vez comenzada la administración de T3.

**(Todos los animales tuvieron acceso ad libitum a pienso y agua; al final de todos los procedimientos se extrajeron los tejidos (cerebro, musculo, BAT, WAT, hígado) y suero).**

### TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### **Extracción de proteína**

En el momento inicial de la extracción se separó una porción de tejido para ser procesado y el resto de la muestra se volvió a congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Durante todo el proceso de extracción, las muestras estuvieron refrigeradas a  $0^{\circ}\text{C}$  para evitar la degradación de las proteínas. En un tubo eppendorf de 2 ml con cierre de seguridad (*Safe-Lock Tubes 2.0 ml, Eppendorf, Hamburgo, Alemania*) se le añadió un volumen determinado de tampón de lisis (composición en tabla) con inhibidor de proteasas (*Complete TM, Roche, Mannheim, Alemania*), dependiendo del tejido del que se fuera a extraer proteína (volumen entre 200  $\mu\text{l}$  y 1000  $\mu\text{l}$ ). Además dependiendo del tipo de análisis que se fuera a realizar con estas proteínas, el tampón variaría para análisis de actividad enzimática (se usa un tampón de lisis de sacarosa, composición en sección ‘*ensayos enzimáticos*’) o cuantificación de expresión proteica (tabla composición tampón de lisis). Las muestras se homogeneizaron por un proceso de disgregación y rotura celular mecánica mediante un homogeneizador (*TissueLyser II, Qiagen, Germantown, MD, USA*) durante 2-3 minutos con una frecuencia de unas 30 Hz. Posteriormente, se centrifugaron durante 30 minutos a 13.200 rpm y a  $4^{\circ}$  centígrados (en el caso de WAT y BAT se realizó otra centrifugación de unos 10 minutos para eliminar mejor la grasa). Se retiró el sobrenadante en varias alícuotas y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de su análisis.

<b>Composición Tampón de lisis (ajustar pH a 7,5 y H2O destilada hasta 500 ml)</b>	
Tris-HCL pH 7,5	2,5 ml
EGTA 0,2 M (pH8)	2,5 ml
EDTA 0,2 M (pH8)	2,5 ml
Tritón X-100	5 ml
Ortavanadato Sódico 0,1 M	5 ml
Fluoruro Sódico	1 gramo
Pirofosfato Sódico	1,1 gramo
Sacarosa	46 gramos
<i>Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE) 1 pastilla por cada 50 ml</i>	

### **Cuantificación de proteína**

Para determinar la concentración de proteína en las alícuotas obtenidas en la extracción (tanto para medir su actividad o su expresión) se mantuvieron a 4°C en hielo y se utilizó procedimiento realizado por el método colorimétrico de *Bradford* (referencia 1976), utilizando el kit *Bio-Rad Protein Assay* (*Protein Assay Dye Reagent, Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). Para ello, se procedió a diluir cada muestra por un factor de 1:26 en H<sub>2</sub>O destilada tubos eppendorfs. En una placa de 96 pocillos, se cargaron por duplicado 10 µl de cada muestra, y posteriormente 250µl de reactivo de Bradford diluido en proporción 1:4 en H<sub>2</sub>O destilada y a una temperatura de 37°C. Además en cada placa, se realizó una recta de calibrado, mediante una dilución seriada de BSA (*Albumin bovine fraction V powder, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*) con 7 puntos duplicados, (0,03125; 0,0625; 0,125; 0,125; 0,25; 0,5; 0,7 y 1mg/ml). Luego en un lector de placas (Multiskan Go Microplate Spectrophotometer, *Thermo Scientific, Rockford, IL, USA*) se incubó la placa durante 5 min a 37° y se midió la colorimetría en OD (optical density) en cada pocillo a una longitud de onda de  $\lambda=595\text{nm}$ . A través de la extrapolación de los valores de la recta de calibrado se determinó la concentración de proteína de cada muestra. Una vez determinada la cantidad de proteína de cada muestra se prepararon alícuotas a la concentración necesaria para cada análisis (10-20 µg/16 µl).

### **Western Blot**

#### 1) Preparación de las muestras

Las proteínas son separadas mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electroforesis*). Al tratarse de una técnica que se basa en la separación de proteínas por su masa molecular, en base a su migración en un campo eléctrico, es necesario neutralizar una serie de características de las proteínas que darían lugar a patrones de migración erróneos e identificaciones incorrectas. Por un lado, es necesario eliminar la estructura cuaternaria de la proteína para poder reproducir una migración en el gel lo más proporcional posible a su tamaño. Y por otro lado, dado que las proteínas van a estar sometidas a un campo eléctrico, es necesario eliminar la carga intrínseca de los polipéptidos, (desnaturalizarlos) y otorgarles el mismo signo de carga.

Para ello, se preparó una alícuota de cada muestra, con la misma concentración de proteína total (10-20 µg) en tampón de lisis con inhibidor de proteasas. A cada muestra además se le añadió la misma proporción de solución de carga 5x. Este tampón de carga proporciona a la alícuota la eliminación de la estructura 4ria de la proteína ( *$\beta$ -mercaptoetanol, Sigma-Aldrich,*

St. Louis, USA), uniformiza su carga eléctrica de forma proporcional a su longitud (*SDS*, *Sodium DodecylSulfate*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA), una densidad mayor (*Glicerol*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). Todo esto facilita su carga en el gel y además posee un colorante, para identificar el frente de migración (*azul de bromofenol*, *MERK*, Darmstadt, Alemania).

<b>Composición del tampón de carga (ajustar pH a 6,8 y H<sub>2</sub>O miliQ hasta 1L)</b>	
SDS	2 g
Trizma-base	8 ml
$\beta$ -mercaptoetanol	1 ml
Azul de bromofenol	4 mg
Glicerol	10 ml

## 2) Electroforesis.

La electroforesis se realizó en un gel que consiste de una estructura tridimensional, en forma de red, formada por la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida (N,N-metilenobisacrilamida). El proceso de polimerización se cataliza por amonio persulfato (APS) (*Ammonium persulfate*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA) y *TEMED* (*N,N,N,N-tetramethyletilenediamina*, *Sigma-Aldrich*, St. Louis, USA). La concentración de acrilamida y bis-acrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution 29:1, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) en el gel determina el tamaño de los poros de la red tridimensional y el grado de migración de las proteínas según su tamaño. El gel consiste de dos fracciones, una fracción concentradora con 4 % de acrilamida/bis-acrilamida, en la que se agrupan las muestras a cargar, de manera que la separación de las proteínas de las diferentes muestras ocurra de forma simultánea, y una fracción separadora con 6%, 8% y 10% en función del tamaño de la proteína de interés. Los geles se montaron en un kit de electroforesis (*Mini-PROTEAN Tetra Cell*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se sumergieron en tampón *running* 1x. (**Composición del tampón de running 5X:** 72 g de Glicina, 15 g de Trizma base, 5 g de SDS, H<sub>2</sub>O destilada hasta 1L).

Previamente a la carga de las muestras en el gel se agitaron y se calentaron a 95° C durante 10 minutos y se volvieron a agitar. En cada pocillo del gel se cargaron 16  $\mu$ l de muestra. En uno de los carriles se cargaron 5  $\mu$ l de un marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Standards-Dual Color*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). En cada gel se cargaron siempre muestras de todos los grupos experimentales.

Una vez esto, se sometieron las muestras a un campo eléctrico (voltaje constante de 140V-120V y amperaje de 180 mA), conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (*PowerPac HC High Current Power Supply*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), en el que se indujo

la migración de las proteínas hacia el cátodo. Se detuvo la electroforesis cuando el frente de migración llegó a una distancia aproximada de unos 0,5 cm del final del gel.

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

**Gel concentrador 4% (igual para todos):** H<sub>2</sub>O destilada 3,4 ml; Acrilamida/bisacrilamida (30%) 0,83 ml; 1,5M Tris (pH 8,8) 0,63 ml; SDS 10 % 50 µl; APS 10 % 50µl; TEMED 5 µl.

### 3) Transferencia.

Una vez finalizada la electroforesis las proteínas deben ser transferidas a una membrana para poder realizar el análisis de expresión de cada proteína; para ellos son sometidas a un campo eléctrico capaz de movilizar las proteínas hasta la membrana donde quedaran adsorbidas y donde se realizaran las incubaciones con los diferentes anticuerpos. Se realizó una transferencia de tipo semi-seca, donde la membrana y el gel se situaban una debajo del otro y separadas por papeles absorbentes estos y las placas que creaban el voltaje (*Trans-Blot Semy-Dry Transfer Cell, Bio-Rad*). Se utilizaron membranas de PVDF (*Polivinylidene Fluoride Immobilion-P membrane, Millipore*), cortadas con unas dimensiones de 8,5x6,5 cm, activadas previamente durante 4 min en metanol, 5 min en H<sub>2</sub>O destilada y 5 min en tampón de transferencia.

**Composición del tampón de transferencia 25X:** 36,5 g de Glicina, 72,5 g de Trizma base, 4,5 g de SDS, H<sub>2</sub>O destilada hasta 500 ml.

**Composición del tampón de transferencia 1X:** 40 ml de tampón de transferencia 25X, 200 ml de Metanol, H<sub>2</sub>O destilada hasta 1L.

El papel transferencia (*Extra Thick Blot Paper, Bio-Rad*) se empapó en tampón de transferencia para que a través de él pudiera crearse el campo eléctrico necesario para la

transferencia; el gel y la membrana se colocaron entre dos piezas de papel de transferencia de manera que así se creó un campo eléctrico necesario para la correcta transferencia; se eliminaron las posibles burbujas que podían quedar entre esta, el papel y el gel con un rodillo. Se realizó la transferencia durante 1h y 40min a un amperaje constante de 250mA conectando el kit de electroforesis a una fuente de energía (*PowerPac HC High Current Power Supply*, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para comprobar la correcta transferencia se tiñeron las membranas con colorante Rojo de *Ponceau* (*Ponceau S Red*, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Para eliminar la tinción fue suficiente con hacer un par de lavados con tampón de lavado.

#### 4) Inmunodetección de proteínas.

Tras la transferencia la membrana se incubo a temperatura ambiente durante 1h con tampón de bloqueo (**Componentes del tampón de bloqueo:** BSA 3g en 100ml de tampón de lavado). De esta manera se eliminaron las uniones inespecíficas ofrecidas por la membrana en todas aquellas áreas donde no existía proteína transferida. Posteriormente, se cortó la membrana tomando como referencia el marcador de pesos moleculares, de manera que, pudiéramos detectar en una misma membrana proteínas diferentes, de esta forma se pudieron detectar diferentes proteínas simultáneamente. Cada fragmento de membrana se incubó durante 1h a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (dependiendo del anticuerpo y sus condiciones específicas; ver **tabla**) diluido previamente en el tampón de bloqueo. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se retiró y se hicieron 3 lavados de 5 min con tampón de lavado a temperatura ambiente. Seguidamente se incubaron las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con *Horseradish Peroxidase* capaz de reconocer y unirse específicamente al anticuerpo primario utilizado.

Anticuerpo Primario	Casa comercial	Dilución
ACC $\alpha$	Millipore; Billerica, MA, USA	1:1000
pACC	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
AMPK $\alpha$ 1	Millipore; Billerica, MA, USA	1:1000
AMPK $\alpha$ 2	Upstate; Temecula, CA, USA	1:1000
pAMPK $\alpha$	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:2000
FAS	BD, Franklin Lakes, NJ, USA	1:1000
CPT1c, CPT1l, CPT1m	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
UCP-1	Abcam; Cambridge, UK	1:20000
GRP78	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
ATF6 $\alpha$	Santa Cruz;	1:1000
PERK	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
pPERK	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
peIF2 $\alpha$	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
CHOP	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
IRE $\alpha$	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
pIRE $\alpha$	Abcam; Cambridge, UK	1:1000
p-SAPK/JNK	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:2000
JNK	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:2000
p-c-Jun	Cell Signaling; Danvers, MA, USA	1:1000
pSTAT3	Abcam; Cambridge, UK	1:1000
PKC $\epsilon$	Abcam; Cambridge, UK	1:1000
PKC $\delta$	SCBT; Dallas, Texas, USA	1:1000
$\beta$ -actina	SIGMA; St. Louis, MO, USA	1:5000
$\alpha$ -tubulina	SIGMA; St. Louis, MO, USA	1:5000

**Tabla:** Relación de anticuerpos usados y dilución de los mismos.

**Componentes tampón de lavado 10X:** 24,2 g de Trizma base, 80 g DE NaCl, H<sub>2</sub>O destilada hasta 1L; ajustar pH a 7,6. **Componentes tampón de lavado 1X:** 100 ml de tampón de lavado 10X, 1 ml de Tween 20, H<sub>2</sub>O destilada hasta 1L.

##### 5) Revelado y fijación de la señal.

Se retira el anticuerpo secundario y se vuelven a hacer tres lavados; para proceder al revelado de la membrana se utilizó 1 ml de un sustrato de revelado que detecta el Horseradish Peroxidase en proporción 1:1 (*Pierce ECL Western Blotting Substrate, Cytok*). Se incuban las membranas durante 2 min en oscuridad con este sustrato. Una vez pasado el tiempo de incubación se colocaron las membranas en una casete de revelado (*Hypercasette, Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido*) y se impermeabilizaron con la ayuda de papel transparente.

Se procedió a su revelado en una sala oscura destinada a tal fin. Se introdujo una hoja de revelado (*FujiMedical X-Ray Film Super RX, Fujifilm Corporation, Tokio, Japón*) sobre las



membranas y se cerró el casete; se dejó exponer la señal quimioluminiscente durante unos segundos/minutos en función de la proteína. Luego se retiró la película y se sumergió en una solución reveladora (dilución 1:10) (*G150, Developer/Replenisher, Agfa-Gevaert Group, Dubendorf, Suiza*) hasta que se visualiza la señal buscada y en ese momento se sumerge la película en líquido fijador (dilución 1:5) (*G354, Manual Fixing Bath, Agfa-Gevaert Group, Dubendorf, Suiza*) durante un par de minutos con el fin de fijar la señal. Por último se lava la película con agua corriente y se deja secar.

#### 6) Cuantificación.

La cuantificación de la señal se realizó mediante la medición de la densidad óptica de la señal de cada muestra, a partir de las imágenes escaneadas (resolución 400 ppp, CanonScan 9900F, Canon, Tokio, Japón) de las películas autorradiografiadas, con el software informático ImageJ (*ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, NIH, USA*).

Cada medición de densidad óptica se corrigió por la medición de la densidad óptica de una región adyacente a la señal de las muestras.

### **RT-PCR**

#### 1) Extracción de RNA.

Todo el proceso se realizó manteniendo las muestras en hielo con el fin de evitar la degradación del RNA.

Un pequeño fragmento de las muestras congeladas fue homogeneizado mecánicamente junto con 1000 µl de Trizol (*TRIZOL Reagent; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) durante 3 min (con el mismo sistema usado en el caso de la extracción proteica). Después de la homogeneización las muestras se dejaron reposar a T<sup>a</sup> ambiente durante unos 5 minutos. A continuación se añadió 1 ml de cloroformo (*Chloroform, Sigma-Aldrich, St Louis, USA*) a cada muestra y se agitaron fuertemente durante varios segundos con un posterior tiempo de reposo de unos 5 minutos. Luego, se centrifugaron 15 minutos a 12000 rpm a 4°C y se observó ya claramente 2 fases: una fase acuosa (donde se halla el RNA) y una fase orgánica (que contiene las proteínas y los lípidos). Entre ambas se sitúa la inter-fase (donde está el DNA). Se retira la fase acuosa con cuidado pasándola a otro tubo autoclavado y se desprecia la fase orgánica. De esa manera se separó el RNA del resto de los componentes celulares.

Una vez separado el RNA, se le añadió 1 ml de isopropanol (2-propanol, *Sigma-Aldrich, St Louis, USA*) a cada muestra, se agitaron y se colocaron a -20°C durante unos 10 minutos (consiguiendo así que el RNA precipite). Transcurrido este tiempo se centrifugaron las muestras

10 minutos a 12000 rpm a 4°C para concentrar el RNA en el fondo. Una vez eliminado el sobrenadante se añadió 1 ml de etanol (*Ethanol absolute PA, Applichem/Pancreac*, Darmstadt, Alemania) al 70% en H<sub>2</sub>O DEPC y tras una agitación corta se centrifugó durante unos 5 minutos a 12000 rpm y 4°C. Para eliminar la mayor cantidad de etanol posible, se volvió a centrifugar 1 minuto a 13500 rpm y 4°C, y posteriormente se retiró el sobrenadante con una pipeta. Finalmente se re-suspendió en H<sub>2</sub>O DEPC calentándolo a 60 °C durante 15 minutos.

## 2) Cuantificación de RNA.

La cuantificación de RNA de cada muestra se determinó en un espectrofotómetro ajustado a 2 longitudes de onda: 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm proporcionó la cantidad de ácidos nucleicos y a 280nm la cantidad de proteína. El grado de pureza de la muestra se determinó estudiando el ratio 260/280, considerándose aceptable la oscilación entre 1,4 y 1,8. Todas las muestras se alicuotearon a una concentración de 100ng/μl.

## 3) Retrotranscripción (RT).

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen total de 30 μl (Ver componentes de la RT). Se realizó una un control negativo (RT-) (30 μl de mezcla de reacción excepto m-MLV, cuyo volumen fue sustituido por H<sub>2</sub>O MilliQ). Una vez preparadas las mezclas de reacción, se incubaron en un termociclador, con los siguientes parámetros: 50 minutos a 37°C, 15 minutos a 42°C, 5 minutos a 95°C. Finalmente las muestras se mantuvieron a 4°C o bien congeladas -20°C hasta su uso.

### **Componentes de la reacción de retrotranscripción:**

- 6 μl de tampón de reversotranscripción (5X first strand buffer; 250 nM Tris-HCl, pH 8.3, 375nM KCl, 15mM MgCl, 50nM DDT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 1.5 μl Mg<sub>2</sub>Cl 50 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 6 μl de mezcla de dNTPs (dTTp, dCTp, dGTp, dATp, con una concentración de 10 mM de cada uno) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 0.17 μl de *Random primers* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 0.25 μl inhibidor de RNasa (RNaseOUT, 40 U/μl Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- 1 μl de m-MLV reversotranscriptasa (200 U/μl, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- Volumen correspondiente de H<sub>2</sub>O DEPC (agua destilada con dietilpirocarbonato al 0.1%. , dejar una noche a T<sup>a</sup> ambiente) para obtener el volumen final de 30 μl.

#### 4) PCR Tiempo Real (TaqMan).

Se utilizó como sistema de detección las sondas *TaqMan* (sondas específicas marcadas con fluorocromos: donador y aceptor). Está basado en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) entre las dos moléculas. El fluorocromo utilizado para la realización de la PCR fue TAMRA, que posee un máximo de absorción de 560nm y un máximo de emisión de 580nm. Los primers usados fueron diseñados con el programa *Primer Express* (*Applied biosystems*, Foster City, CA, USA) y cotejados según la base de datos BLAST. La mezcla de reacción de PCR usado tenía un volumen final de reacción de 12µl.

#### Componentes de la reacción de PCR en tiempo real:

- 2.92 µl H<sub>2</sub>O-MQ
- 0.36 µl Oligonucleótido sentido (10 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania)
- 0.36 µl Oligonucleótido antisentido (10 µM) (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania)
- 0.36 µl Sonda (5 µM)
- 6 µl Taqman Universal PCR master mix; (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 2 µl de muestra (RT)

Además de las muestras, se cargó un control negativo (-RT), un blanco y una curva patrón tanto para el gen problema como para el control o gen de expresión constitutiva; todo ello se realizó por duplicado. La curva patrón constó de 6 puntos realizados por dilución seriada (1:4) a partir de un volumen total de 30-40µl resultante de la mezcla de distintas muestras de RT (2µl de distintos productos de RT, pero siempre del mismo tratamiento o tejido). Las condiciones de amplificación fueron de 50°C (2min), 95°C (10min), 95°C (15seg) y 60°C (1min) durante 40 ciclos, en un sistema de PCR Tiempo Real (*7300 Real Time PCR System*, *Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). El análisis de los datos se realizó comparando el ratio entre un gen de referencia (en este caso el *Hprt*) y el gen problema entre los diferentes grupos experimentales.

**TABLA de primers y sondas para RealTime PCR**

mRNA	GenBank accession number		Sequence
ACADM	NM_016986	Fw Primer	5'-GCCTTCACCGGATTCATCGT-3'
		Rv Primer	5'-GCACCGCTGACCCATGTT-3'
		Probe	FAM-5'-CCCGGAATACACATCGAAAAAGGAACT-3'-TAMRA
ACER-1	NM_001106875	Fw Primer	5'-CTCATCTTTGGACCCCTCATGA-3'
		Rv Primer	5'-CCATGAAGAGGACTGACTCCAT-3'
		Probe	FAM-5'-CTTATGCACCCGTATGCCAGAAGCG-3'-TAMRA
ACOX-1	NM_017340	Fw Primer	5'-CGGAGTTGATCACGCACATCT-3'
		Rv Primer	5'-GCTGGCTTCGAGTGAGGAAGT-3'
		Probe	FAM-5'-CGGCGCCGTCGAGAAATTGAGAA-3'-TAMRA
CDIPT	NM_138899	Fw Primer	5'-GAACTCTCTACTGCCTCCTGTACCT-3'
		Rv Primer	5'-TCGAAAAGCCCCACAGA-3'
		Probe	FAM-5'-TTCAATTCTCCGAGGGACCACTAGTCGG-3'-TAMRA
CPT1l	NM_031559.1	Fw Primer	5'-ATGACGGCTATGGTGTCTCC-3'
		Rv Primer	5'-TCATGGCTTGCTTCAAGTGC-3'
		Probe	FAM-5'-TGAGACAGACTCACACCGCT-3'-TAMRA
DGAT1	NM_053437	Fw Primer	5'-TTCCGCCTTTGGGCATTC-3'
		Rv Primer	5'-TTGGAAGAAGCGGTTCAATC-3'
		Probe	FAM-5'-CAGCAATGATGGCTCAGTCCCCTG-3'-TAMRA
EHHADH	NM_133606	Fw Primer	5'-TGAAAACAGCCTCTGCTCAAC-3'
		Rv Primer	5'-CCCCACTCTCGAAAAGAAAT-3'
		Probe	FAM-5'-CGTTCTTGCTTGGGAACGATGGG-3'-TAMRA
HPRT	NM_012583	Fw Primer	5'-AGCCGACCGTTCTGTCAT-3'
		Rv Primer	5'-GGTCATAACCTGGTTCATCAC-3'
		Probe	FAM-5'-CGACCCTCAGTCCCAGCGTCGTGAT-3'-TAMRA
LASS1	NM_001044230	Fw Primer	5'-TGCTCCTCTGGTCATGAACAT-3'
		Rv Primer	5'-CAAGTCTCCAGTTCACGCATCT-3'
		Probe	FAM-5'-CTGGTTCCTGTACATTGTGGCTTTGCAGC-3'-TAMRA

LIPIN1	NM_001012111	Fw Primer	5'-CCTCTACTTCTGGCGATGCA-3'
		Rv Primer	5'-CATCTTATCTCTCATGATGGATTCC-3'
		Probe	FAM-5'-TCCAGAAACCTTTGCCAAAGGCCA-3'-TAMRA
NRF-1	NM_001100708.1	Fw Primer	5'-TGTTTGGCGCAGCACCTTT-3'
		Rv Primer	5'-CGC AGA CTC CAG GTC TTC CA-3'
		Probe	FAM-5'- ATGTGGTGGCGCAAGTACAAGAGCATGATC3'-TAMRA
PCYT1a	NM_078622	Assay ID	<i>Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays</i> Assay ID Rn00589584_m1
PGC1α	NM_031347	Fw Primer	5'-CGATCACCATATTCCAGGTCAAG-3'
		RvPrimer	5'-CGATGTGTGCGGTGTCTGTAGT -3'
		Probe	5'-AGGTCCCAGGCAGTAGATCCTCTTCAAGA -3'
PGC1β	NM_176075	Assay ID	<i>Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays</i> Assay ID Rn00598552_m1
PISD	XM_001061408	Fw Primer	5'-TTCTTCCGGCGTAAGCTGAA-3'
		Rv Primer	5'-CCTGCCCAAAGGTGAGGAT-3'
		Probe	FAM-5'-CTGTCTGTGGCTTGCACAGTGTGATCAGC-3'-TAMRA
PLA2g4a	NM_133551	Fw Primer	5'-TTGGATTGTGCGACCTACGTT-3'
		Rv Primer	5'-GGGTGGGAGTACAAGTTGACA-3'
		Probe	FAM-5'-CTGGTCTGTCCGGCTCCACATGGTA-3'-TAMRA
PNPLA2	NM_001108509	Fw Primer	5'-CCGCTGGAGAGTGCAGTGT-3'
		Rv Primer	5'-CACCGGATATCTTCAGGGACAT-3'
		Probe	FAM-5'-CACCATCCGCTTGTGGAGTGGC-3'-TAMRA
PPARα	NM_013196	Fw Primer	5'-TGGAGTCCACGCATGTGAAG-3'
		Rv Primer	5'-CGCCAGCTTTAGCCGAATAG-3'
		Probe	FAM-5'-CTGCAAGGGCTTCTTCGGCGA-3'-TAMRA
PTDSS1	NM_001012113	Fw Primer	5'-ATGGTCGTTTGCCGGTTTT-3'
		Rv Primer	5'-CCCTGTGGTGGTGTGGATGT-3'
		Probe	FAM-5'-ATGAGGACTTACCACTGGGCAAGCTTCAAG-3'-TAMRA
SGMS1	NM_181386	Fw Primer	5'-CGGCATGCACTTCAACTGTT-3'
		Rv Primer	5'-ATTATCCTCCGCACTTGAGCTT-3'
		Probe	FAM-5'-CCGAAGCTCTTTGGAG-3'-TAMRA
SMPD2	NM_031360	Fw Primer	5'-CACCTACCCGGATGCACACT-3'

## Material y métodos

---

		Rv Primer	5'-GATTGGGTGTCTGGAGAACACA-3'
		Probe	FAM-5'-TTCAGAAGCGGAATCATTGGCAGTGG-3'-TAMRA
SPTLC1	NM_001108406	Fw Primer	5'-TGACCTGGAGCGACTGCTAA-3'
		Rv Primer	5'-CCTTCCGCGACGATGAAT-3'
		Probe	FAM-5'-CAAAGAATCCTCGAAAGGCCCGTG-3'-TAMRA
UCP-1	NM_012682	Fw Primer	5'-CAATGACCATGTACACCAAGGAA-3'
		Rv Primer	5'-GATCCGAGTCGCAGAAAAGAA-3'
		Probe	FAM-5'-ACCGGCAGCCTTTTCAAAGGGTTTG-3'-TAMRA
UCP-2	NM_019354	Fw Primer	5'-GCCTCTACGACTCTGTAAAGCAGTT-3
		Rv Primer	5'-CGGACCTTTACCACATCTGTAGGT-3
		Probe	FAM-5'-TACACCAAGGGCTCAGAGCATGCAGG-3'-TAMRA
UCP-3	NM_013167	Assay ID	Applied Biosystems TaqMan® Gene Expression Assays Assay ID Rn00565874_m1

---

### Ensayos enzimáticos

- Actividad enzimática de CPT-1.

La obtención primaria de las proteínas para actividad enzimática a partir de los tejidos, se realizó de la misma manera que para la obtención de proteína total, con la salvedad de que el tampón de lisis para actividad que se utilizó tenía una composición diferente al tampón de lisis (Buffer de sacarosa; mantiene la capacidad enzimática del péptido pero es menos eficaz a la hora de purificar la proteína).

Composición Tampón de lisis de sacarosa (disuelto en H <sub>2</sub> O destilada)	
Tris-HCL pH 7,5	20 mM
EDTA	1 mM
Fluoruro Sódico	100 mM
Ditiotreitol (DTT)	100 mM
Sacarosa	250 mM
<i>Cóctel inhibidor de proteasas (ROCHE) 1 pastilla por cada 50 ml</i>	

Antes de realizar cualquier ensayo enzimático fue indispensable cuantificar la cantidad de proteína obtenida en la extracción. De manera que, a la hora de analizar los resultados, se normalizaron con las concentraciones proteicas de cada alícuota.

La determinación de la actividad CPT-1 se realizó determinando la liberación de grupos CoA-SH del palmitoil-CoA usando el método descrito por Bieber (Bieber et al., 1972). Este método se basa en la reacción del grupo sulfhidrilo con el reactivo de *Ellman* (ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzoico)) y en la variación que se produce en la absorción del mismo a 412 nm.



Reacción catalizada por CPT-1

Los grupos tiol (-SH) de los aminoácidos sulfurados de las proteínas suelen encontrarse en su forma reducida, como sulfidrilos, y son estables a la oxidación en medio ácido. El procedimiento utilizado para su cuantificación, desarrollado por *Ellman* en 1959 (ELLMAN, 1959) consiste en oxidar los grupos sulfhidrilo de las muestras con un disulfuro simétrico (ácido 5-5'-ditiobis [2- itrobenzoico]; *DTNB*; *reactivo de Ellman*) que, al reducirse, genera un disulfuro mixto y un anión tiolato (5-tio-2-nitrobenzoato; *TNB*). Este puede cuantificarse espectrofotométricamente debido a su fuerte absorción a 412 nm (coeficiente de extinción de  $13'6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (figura 32). De este modo el reactivo del *Ellman* (*DTNB*) permite la determinación espectrofotométrica de los grupos sulfhidrilo reactivos presentes en la reacción.

La medida de actividad se realiza durante 7 minutos a 412 nm en un tampón de medida: 60 mM TRIS-HCl (pH 8), 2.125 mM EDTA, 1.7 mM DTNB, 0,17% TRITÓN X-100, 0.5 mM L-Carnitina, muestra (20 µl; dilución 1:5). Después de incubar 5 minutos a 37°C el tampón de medida con la muestra, se añaden los sustratos: y 0.5 mM Palmitoil-CoA (excepto en los controles). La actividad enzimática se define como nmol CoA-SH liberado/min/mg proteína.

- Determinación de los niveles de malonil Co-A.

Los niveles de malonil-Co se determinaron mediante una modificación del método radioenzimático de McGarry, basado en la incorporación de acetil-CoA marcado a la molécula de palmitato, en una reacción catalizada por la ácido graso sintasa, en presencia de NADPH y dependiente de malonil-CoA (McGarry et al., 1978; Saha et al., 1995). (Este protocolo fue realizado por el Dr. Asish K. Saha. Diabetes Research Unit, EBRC-827, Boston Medical Center, Boston, MA, USA).



Reacción donde interviene el Malonil-CoA

### **Inmunohistoquímica**

Para el estudio inmunohistoquímico, el cerebro de la rata se fija mediante perfusión intracardiaca tal y como se detalló anteriormente. Una vez fijados los tejidos del animal, se extrae el cerebro y se mantiene inmerso en la misma solución de fijado durante 12 horas a 4°C. A continuación se transfieren a tampón fosfato 0,1M durante 1 hora. Se hacen secciones en un vibrotomo (*Vibratome Series 1000, The Vibratome Company, St Louis, MO, USA*) en secciones de 50 µm de grosor. Las secciones se recogen en PBS.

Para la detección inmunohistoquímica de la expresión de c-FOS, se incubaron secciones del cerebro con anticuerpo primario c-FOS (*Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA*) en dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C; al finalizar se hicieron 2 lavados de 10 minutos. A continuación se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% en agua destilada (para inhibir la peroxidasa endógena) durante 10 min y se hicieron nuevamente 2 lavados de 10 minutos.

Como sistema de detección se utilizó *EnVision policlonal* (polímero de dextrano conjugado con anticuerpos anti-conejo y con peroxidasa; *Dako, Glostrup, Dinamarca*) durante 30 min. Se hicieron 2 lavados de 10 minutos y se incubó con DAB (*Dako, Glostrup, Dinamarca*) durante 10 min, preparada siguiendo el protocolo del fabricante (1 gota de DAB en 1 mL del disolvente suministrado). Al finalizar la reacción, las secciones se extienden en portas xilanizados (*Histobond, Marienfeld-Superior, Lauda-Konigshofen*) dejándolos secar; posteriormente se deshidrataron en etanol, se aclararon en xilol y se montaron con un medio de montaje permanente. La reacción fue observada y fotografiada bajo un microscopio de fluorescencia *Provis AX70 (Olympus Corp.; Tokyo, Japan)*. Además, se cuantificó la inmunoreactividad de c-FOS en DMH. El número de células teñidas en cada sección se usó como número representativo de células con inmunoreactividad positiva de c-FOS.

### **Inmunofluorescencia**

Los cerebros una vez perfundidos se sumergen en formalina al 10% durante 24 horas. Se cortaron secciones de 50 µm de grosor en un vibrotomo (*Vibratome® Series 1000*). Para la inmunofluorescencia, las secciones se incubaron en flotación durante toda la noche a 4°C con anti-GFP de conejo (*Abcam*) diluido 1:1000 en PBS. Tras dos lavados de 5 minutos en PBS las secciones se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anti-fragmento F (ab´)2 *AlexaFluor® 488 (Molecular Probes)* en una dilución en PBS de 1:200. Las secciones se montaron en portas de polisina (*VWR International, Leuven*) y se cubrieron con medio de montaje fluorescente.



## **Bioquímica**

La sangre extraída durante el sacrificio fue centrifugada y separada en suero y plasma. Los niveles de T3 y T4 fueron medidos en plasma mediante la utilización de un kit de ELISA (*Crystal Chem Inc; Downers Grove IL, USA*).

## **Análisis de lípidos**

Para la extracción de lípidos, se pesaron 100 mg de tejido o 250 µl de suero; se homogenizaron (con el mismo sistema usado en la extracción proteica) con 1 ml de reactivo de Folch (cloroformo: metanol, 2:1). Una vez homogenizadas, se mantuvieron en agitación constante durante unas 3 horas temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C. Posteriormente se le añadió a cada muestra 300 µl de agua Mili-Q (en el caso de suero no se añadió agua Mili-Q), se vortearon y se centrifugaron 20 minutos a 13200 rpm. La fase inorgánica fue eliminada y los extractos lipídicos contenidos en la fase orgánica y se dejaron secar toda la noche en una campana de extracción.

Para el análisis de triglicéridos, una vez realizada la extracción de lípidos y una vez secos, se re suspenden en cloroformo (una cantidad conocida e igual para cada muestra) y se dejan evaporar; luego mediante la utilización de un kit enzimático colorimétrico (*Trigliceridos GPO-POD* Enzimático colorimétrico, SPINREACT, Girona, España).

Para la separación de triglicéridos y ácidos grasos libres, el extracto total de lípidos fue resuspendido en cloroformo y detectados a través de placas de cromatografía de capa fina (TLC; Plastic Backed Silica Matrix, Merk; Hoddesdon, UK). La cromatografía se realizó usando tolueno:cloroformo:metanol (85:15:5) como solvente de migración. Las bandas lipídicas fueron visualizados utilizando una solución de primulina; posteriormente fueron raspados e introducidos en viales de centelleo para la cuantificación del C<sup>14</sup> una vez que estuvieran secas.

Para el análisis de ácidos grasos, después de la extracción de de lípidos de 15 mg de tejidos como explicamos anteriormente; como estándar interno se usó Ácido tridecanoico deuterado (C<sub>13</sub>D<sub>25</sub>O<sub>2</sub>H, *Cambridge Isotopes; Andover, MA, USA*). Los lípidos totales fueron saponificados y convertidos en ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando trifluoruro de boro (MORRISON and SMITH, 1964). Las muestras fueron resuspendidas en hexano y se analizaron en *Thermo Finnigan Focus GC* acoplado a un detector FID. Una columna Thermo Scientific TR-FAME (longitud: 30 m, diámetro: 0,25 mm, tamaño de la película: 0,25 µm; Thermo

Scientific; Surrey, Reino Unido) fue usada con helio como gas transportador a una velocidad de infusión de 1,9 ml/min; la temperatura de entrada era de 230°C y la temperatura del detector era de 250°C. El programa usado fue el siguiente: 100 ° C durante 2 min, 25 ° C / min durante 2 min, 2,5 ° C / min durante 4,8 min, mantener durante 3,8 min, 4,5 ° C / min durante 2,4 min, mantener durante 5 minutos, 5 ° C / min durante 7,4 min, 40 ° C / min durante 0,5 min y mantener durante 0,5 min. Los cromatogramas fueron analizados y cuantificados usando el software Xcalibur 2.0 (Thermo Scientific; Surrey, Reino Unido). I

La identificación de los picos FAME se hizo mediante la comparación de los tiempos de retención contra los estándares externos (*Restek 35077 Food Industry FAME mix*; Bellefonte, Pensilvania, USA; y *Supelco 46.904 éster metílico vacénico (Vaccenic Methyl ester)*; Sigma, St Louis, MO, USA).

Los datos se normalizaron con estándares internos y por el ajuste de la masa del tejido. Los resultados se expresan como porcentajes molares normalizados con los animales control.

### **Lipidómica**

Preparación de las muestras: los hipotálamos fueron diseccionados y pesados; se les añadió a cada muestra 20 µl de una mezcla estándar interna y 100 µl de NaCl (0,9%). Los lípidos se extrajeron de las muestras con 400 µl de cloroformo: metanol (proporción 2: 1) y se homogenizaron en un homogeneizador. Después de agitación durante 2 min y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, la capa inferior (aproximadamente 100 µl) se separó por centrifugación a 10.000 rpm durante 3 min a temperatura ambiente. Luego 10 µl de la mezcla estándar marcada fue añadida al extracto de lípidos. La mezcla de patrón interno contenía los siguientes compuestos lipídicos con ácidos heptadecanoico (C17: 0) como ácido graso esterificado: ceramida (d18: 1/17: 0) (91,6 mg / ml; Avanti lípidos polares; Alabaster, AL, USA), GPCholine (17: 0/17: 0) (9,9 mg / ml; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA), GPEthanolamine (17: 0/17: 0) (89,5 g / mL; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) y TG (17: 0/17: 0/17: 0) (103,6 g / ml; Larodan químicos puros; Limhamn, Suecia). La mezcla estándar marcado consistía GPCholine (16: 0/0: 0-D3) (92,8 mg / ml; Larodan Fine Chemicals, Limhamn, Suecia), GPCholine (16: 0/16: 0-D6) (116,8 mg / ml ; Larodan Fine Chemicals, Limhamn, Suecia) y TG (16: 0/16: 0/16: 0-13C3) (99,6 g / mL; Larodan Fine Chemicals, Limhamn, Suecia).

Análisis de lípidos: los extractos de lípidos se analizaron utilizando un espectrómetro de masas QToF (*Waters*; Milford, MA, USA) combinado con un Acquity Ultra Performance

Liquid Chromatography (UPLC/MS; Chicago, IL, USA). La columna era una Acquity UPLC BEH C18 10x50 mm con 1,7 micras de tamaño de partículas; se mantuvo a 50°C. El sistema de disolvente binario A incluyó agua (1% NH<sub>4</sub>Ac 1M, 0,1% HCOOH) y el sistema de disolvente B incluía LC/MS (Rathburn; Walkerburn, Reino Unido) de acetonitrilo / isopropanol (5:2, 1% NH<sub>4</sub>Ac 1M, 0,1% HCOOH). El gradiente comenzó a partir del 65% de A / 35% de B, alcanzando el 100% del B en 6 min y se mantuvo allí durante los próximos 7 min. El tiempo total de ejecución que incluye una etapa de re-equilibrio de 5 minutos fue de 18 min. El caudal fue de 0,2 ml/min y el volumen de inyección fue de 1 µl. La temperatura del organizador de las muestras se fijó en 10 ° C. El perfil de lípidos se llevó a cabo utilizando el modo de ión positivo. Los datos fueron recolectados en el rango de masa de m/z de 300 a 2000, con una duración de exploración de 0,2 segundos. La fuente de temperatura se fijó en 120 ° C y el nitrógeno fue usado como gas de de solvatación (800 L/h) a 250 ° C. Los voltajes del cono de muestreo y del capilar fueron 39 V y 3,2 KV, respectivamente. La reserpina (50µg / L) fue utilizada como compuesto de referencia de pulverización de bloqueo (5 l / min; 10 seg. frecuencia de exploración).

#### Procesamiento de los datos de lipidómica y análisis.

Los resultados obtenidos se convierten en formato *netCDF* usando *Dbridge Software* (MASSLYNX. Waters; Milford, MA, USA). Los datos convertidos se procesan usando el programa informático *MZmine Software* version 0.60 58-60 (440-442). Los lípidos se identificaron basándose en su tiempo de retención (RT) y el ratio masa/carga (MZ) a partir de una base de datos ya creada. (Realizado por el Dr. Matej Orešic. VTT Technical Research Centre of Finland, Tietotie 2, Espoo, FIN-02044, Finland).

#### Cuantificación de ceramidas

Las ceramidas se extrajeron y analizaron utilizando un el sistema ESI-MS LC / MS System (API 3000 PE Sciex; SpectraLAB Científico; Markham, Ontario, Canadá) con ionización positiva como hemos descrito previamente (Contreras et al., 2014b). Las concentraciones se midieron por monitorización de reacción múltiple (MRM) utilizando N-heptadecanoilo-D-erythro-esfingosina (C17- ceramida) como estándar interno (50 ng / ml). El método fue lineal en el intervalo de 2 a 600 ng / ml utilizando como patrones N-palmitoil-D-erythro-esfingosina (C16 ceramida) y N-estearoil-D-erythro-esfingosina (C18 ceramida) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA). (Realizado por la Dra. Nuria Casals. Departament de Ciències Bàsiques Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Internacional de Catalunya).

### **Tinción Oil-Red O**

La tinción Oil-Red O se realizó en fragmentos de hígado congelados. Se realizaron cortes en un criostato de un grosor de 10 micras. Posteriormente se fijaron las muestras toda la noche en formalina neutra tamponada al 10%. Luego fueron teñidas con Solución Oil Red durante 20 minutos (*Oil red color solution*, Merck) y posteriormente se lavaron con agua destilada. Se sometieron a otro colorante y se contratiñen con Hematoxilina de Harris durante 10 minutos. (Hematoxilina de Harris, Bio-optica). Se vuelven a lavar y se montan en un medio de montaje acuoso. Luego se realizan fotos en un microscopio óptico conectado a una cámara Olympus a aumentos 20x y 40x. Para finalizar las fotos fueron medidas mediante el programa Image J (*ImageJ 1.40g*, Wayne Rasband, NIH, USA).

### **Estadística**

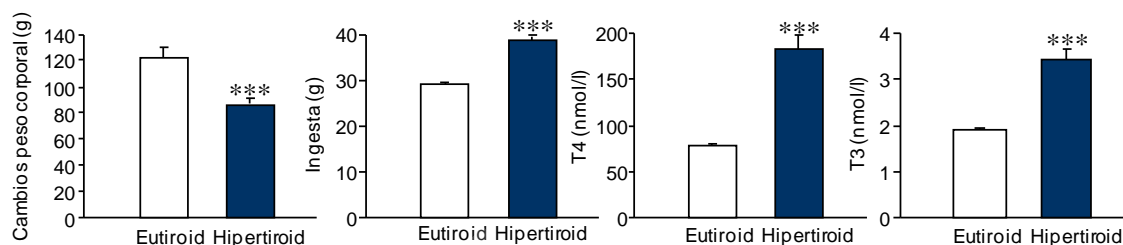
Los datos obtenidos en todos los experimentos se analizaron mediante el software estadístico GraphPad Instad (*GraphPad Instad Software*, v5, La Jolla, CA, USA). El grado de significación estadística se determinó, para los experimentos de 1 variable se ha realizado t-test y ANOVA, mientras que para aquellos con 2 o más variables se utilizó un análisis estadístico ANOVA seguido de un test post-hoc *Bonferroni*. Los resultados se representaron en porcentaje en función del control, tomándose como valor la media (M) y la desviación estándar de la media (SEM) ( $media \pm SEM$ ). En los experimentos en los que se monitorizaron parámetros como la ingesta de alimento y masa corporal, estos datos se representaron brutos sin realizar ningún tipo de relación porcentual de comparación. Se consideraron significativos todos los resultados con una  $P < 0,05$ ; muy significativos con una  $P < 0,01$  y extremadamente significativos con  $P < 0,001$ .





**Las ratas hipertiroides muestran una marcada alteración en la ruta de la lipogénesis *de novo* en tejidos periféricos.**

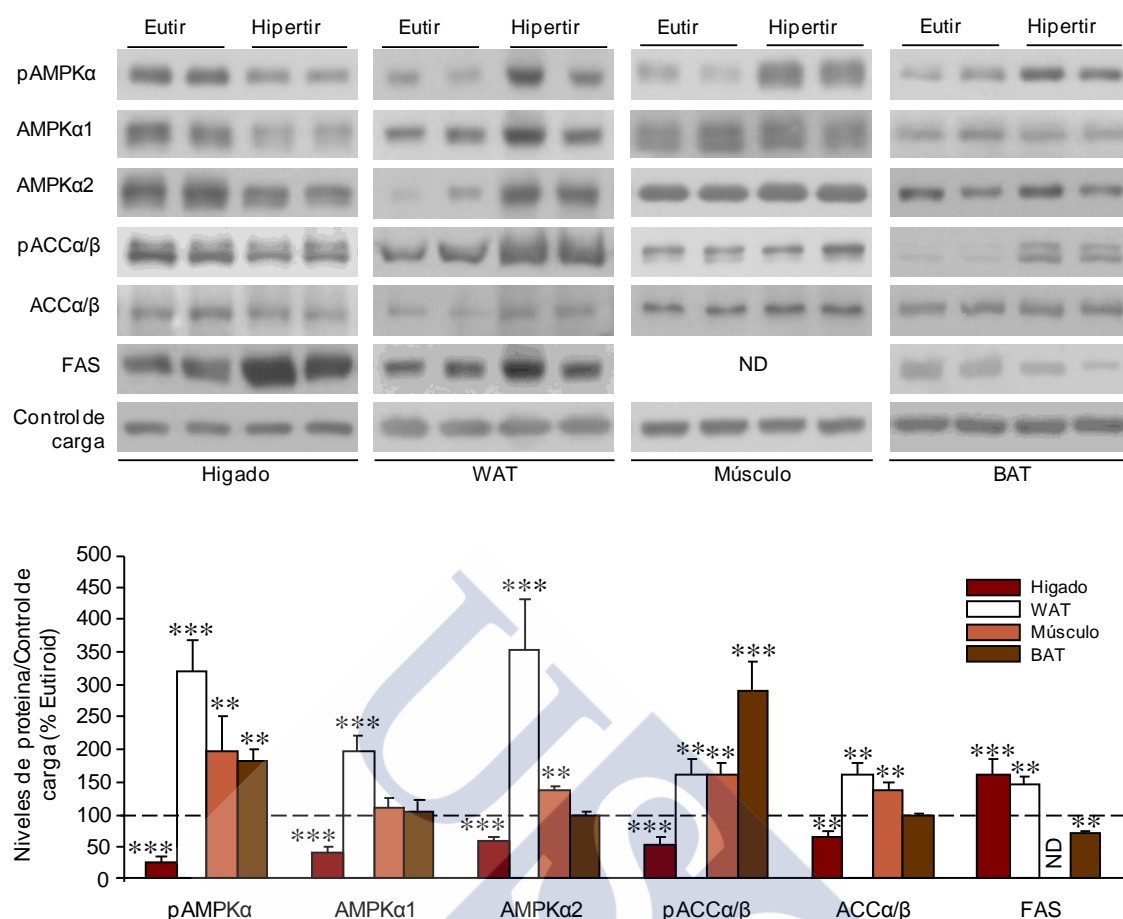
Las ratas tratadas con T4 muestran un descenso en la ganancia de masa a pesar de una marcada hiperfagia; además presentan unos niveles circulantes de T4 y T3 elevados, confirmando su estado hipertiroido (**Figura 1**).



**Figura 1.** Efecto de la administración periférica de hormonas tiroideas. Cambios en la masa corporal ( $n=16-18$  por grupo), la ingesta ( $n=16-18$  por grupo) y los niveles circulantes de T4 y T3 ( $n=9-10$  por grupo) en ratas hipertiroides y sus controles (ratas eutiroides). \*\*\* $P<0.001$  vs. eutiroides.

Nos centramos en los efectos del hipertiroidismo en la lipogénesis *de novo* en tejidos periféricos. Nuestros datos mostraron que las ratas hipertiroides poseen una marcada disregulación en las enzimas lipogénicas en tejidos periféricos. Mientras en el hígado el efecto global de hipertiroidismo fue promover la lipogénesis *de novo* (con un descenso en los niveles de pAMPK/pACC y un incremento de FAS), en músculo, WAT y BAT el efecto global fue el efecto opuesto, con un pronunciado descenso en los marcadores lipogénicos (**Figura 2**).

## Resultados

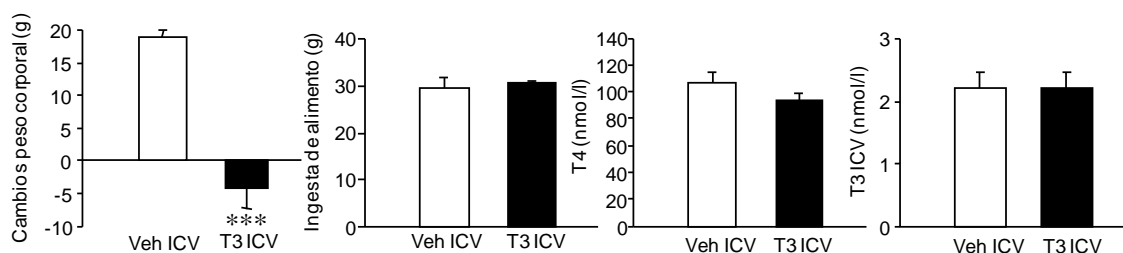


**Figura 2.** Efecto de la administración subcutánea de T4 sobre la ruta de AMPK en tejidos periféricos. Cuantificación de los niveles de proteína e imágenes autorradiográficas representativas (panel superior) de western blot de diferentes enzimas implicadas en la ruta de AMPK en hígado, WAT, BAT y músculo ( $n=8-22$  animales por grupo) de ratas hipertiroideas y sus respectivos controles. Para simplificar las gráficas, las barras de los controles (ratas eutiroideas) se han sustituido por una línea discontinua que representa el 100%. En las muestras de músculo, la expresión de FAS no fue detectada (ND). Los valores están normalizados con  $\beta$ -actina en el caso de hígado y WAT, y con  $\alpha$ -tubulina en el caso de músculo y BAT. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. Eutiroideas.

### La T3 a nivel central regula la ruta de la lipogénesis de novo en hígado y BAT.

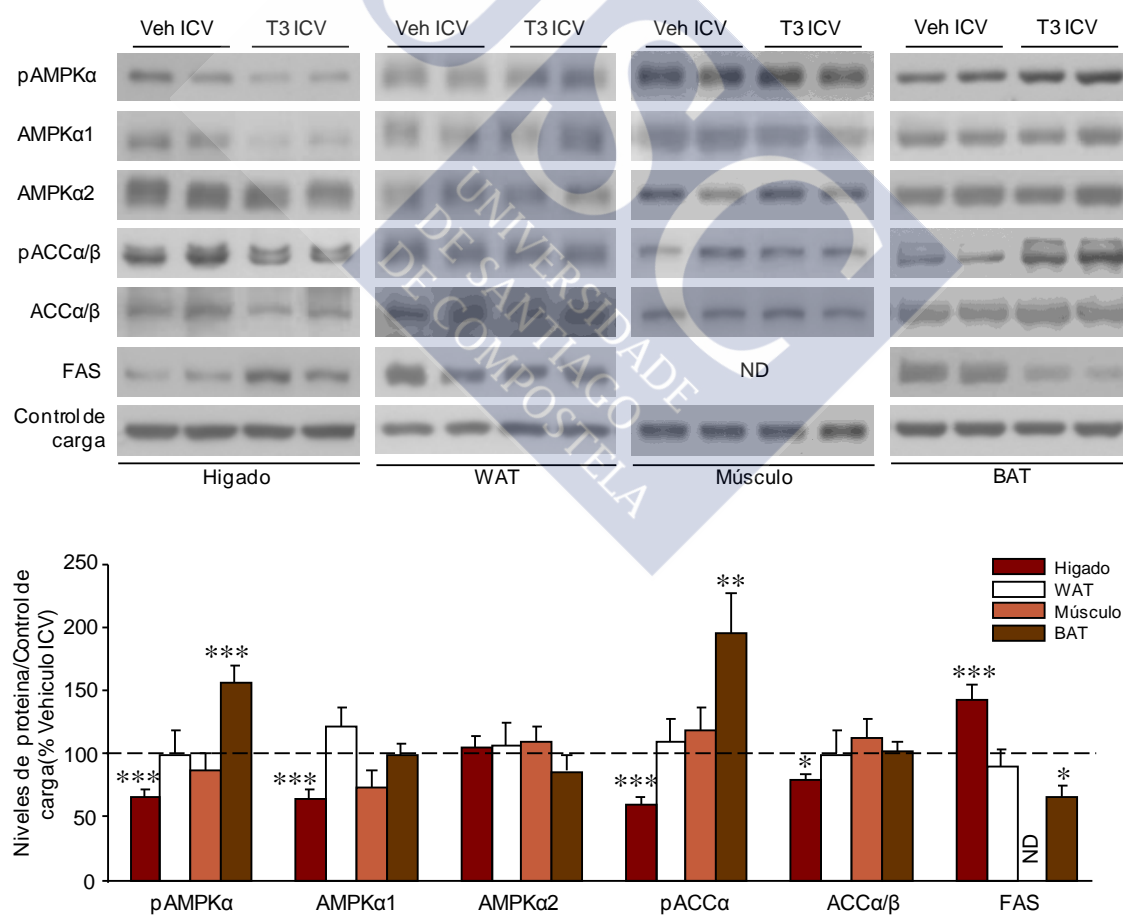
Investigamos si el efecto del hipertiroidismo en el metabolismo periférico de los lípidos era central o periférico. Para ello, las ratas fueron tratadas crónicamente ICV con T3 durante 5 días. Como en el caso de las ratas hipertiroideas inducido por la administración de T4 periférica, el tratamiento crónico ICV con T3 induce una marcada pérdida de masa corporal (Lopez et al., 2010b), pero no se observaron cambios en la ingesta ni en los niveles circulantes de T3 y T4 (Figura 3).





**Figura 3. Efecto de la administración central de hormonas tiroideas.** Cambios en la masa corporal ( $n=9-10$  animales por grupo), la ingesta ( $n=9-10$  animales por grupo) y los niveles circulantes de T4 y T3 ( $n=8-10$  animales por grupo) en ratas tratadas ICV con T3 y sus controles, vehículo ICV. \*\*\* $P<0.001$  vs. Vehículo ICV.

Para caracterizar los efectos de la administración central de T3, examinamos las enzimas de la lipogénesis *de novo* en los tejidos periféricos y observamos que la administración central de T3 provoca exactamente el mismo patrón de expresión proteica observado en ratas hipertiroides en el hígado y el BAT; sin embargo no se observaron cambios en WAT y músculo (**Figura 4**).

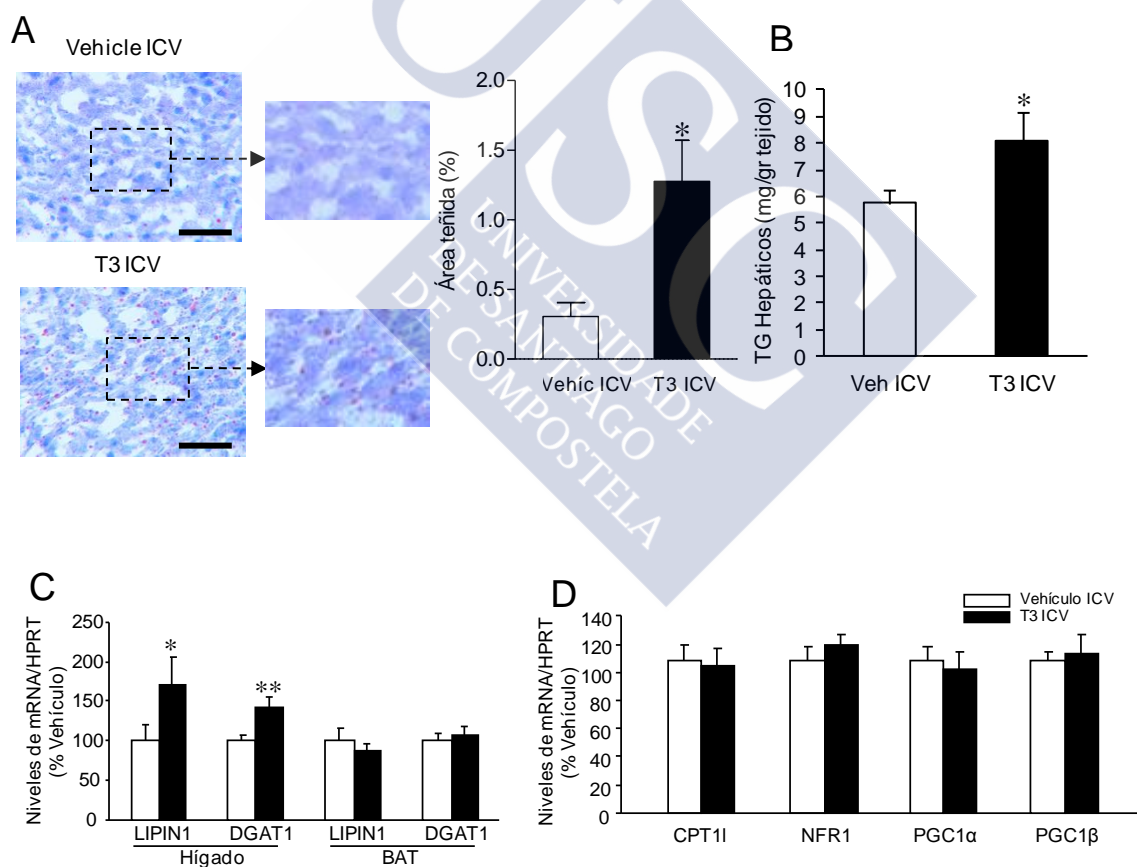


**Figura 4. Efecto de la administración central de T3 sobre la ruta de AMPK en tejidos periféricos.** Cuantificación de los niveles de proteína e imágenes autorradiográficas representativas (panel superior) de western blot de diferentes enzimas implicadas en la ruta de

## Resultados

*AMPK en hígado, WAT, BAT y músculo (n=8-17 animales por grupo) de ratas tratadas con T3 ICV y sus respectivos controles (vehículo ICV). Para simplificar las gráficas, las barras de los controles se han sustituido por una línea discontinua que representa el 100%. En las muestras de músculo, la expresión de FAS no fue detectada (ND). Los valores están normalizados con  $\beta$ -actina en el caso de hígado y WAT, y con  $\alpha$ -tubulina en el caso de músculo y BAT. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. Vehículo ICV.*

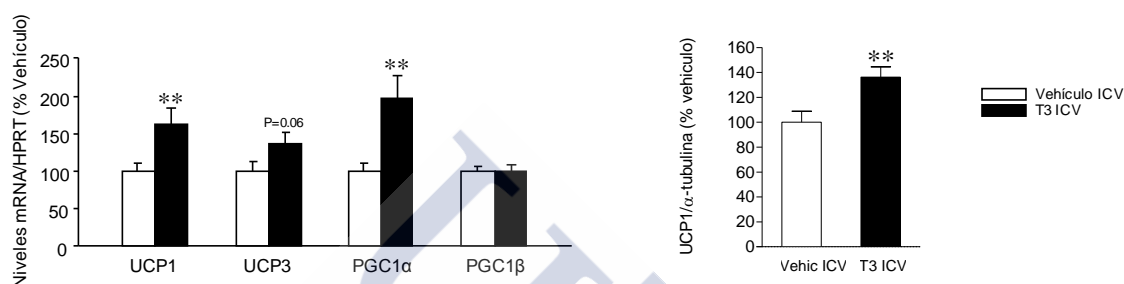
De acuerdo con estos datos, observamos un incremento en la esteatosis hepática y en los niveles de TG hepáticos (**Figura 5A-B**), además de un incremento en los niveles de expresión de enzimas que catalizan la formación de diacilglicerol y TG, LIPIN1 y *diacylglycerol O-acyltransferase 1* (DGAT1) respectivamente (**Figura 5C**). No se encontraron cambios en la expresión de genes implicados en la oxidación de lípidos como son CPT1I, NFR1 y PGC1 $\alpha$  y  $\beta$  (**Figura 5D**).



**Figura 5. Efecto de la administración central T3 sobre el metabolismo lipídico periférico.** (A) Imágenes representativas y análisis de secciones de hígado sometidas a tinción Oil Red O (20X; barra de escala: 100 $\mu$ m) (n=8-9 animales por grupo), (B) niveles de triglicéridos hepáticos (n=8-9 animales por grupo), (C) niveles de expresión en hígado y BAT de LIPIN1 y

*DGAT1* ( $n=8-10$  animales por grupo) y **(D)** cuantificación de los niveles de expresión de genes implicados en la oxidación de lípidos a nivel hepático ( $n=8-10$  animales por grupo) de ratas tratadas ICV con T3 y sus controles (Vehículo ICV).  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$  vs. Vehículo ICV.

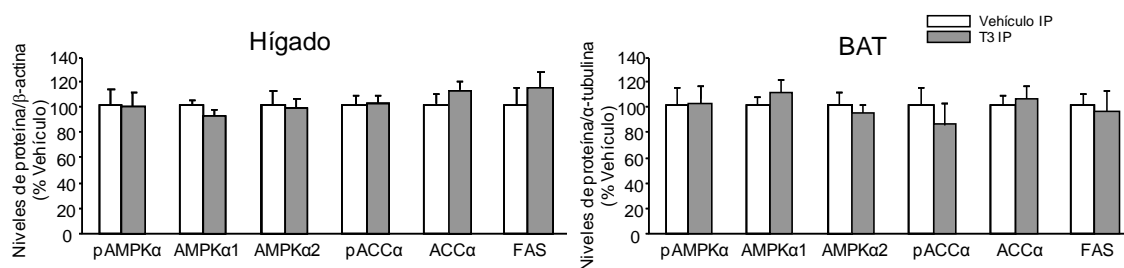
La expresión de marcadores termogénicos, UCP1, UCP3, PGC1 $\alpha$  y  $\beta$ , estaban incrementados en el BAT después de la administración central de T3 (**Figura 6**).



**Figura 6.** Efecto de la administración central de T3 sobre el programa termogénico. Cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores termogénicos ( $n=8-10$  animales por grupo) y niveles proteicos de UCP1 ( $n=7$  animales por grupo) en BAT de ratas tratadas ICV con T3 y sus controles (Vehículo ICV).  $**P<0.01$  vs. Vehículo ICV.

Nuestros resultados indican que el efecto central de T3 en el hígado y BAT fue mediado por acción directa de las hormonas tiroideas en el CNS y no como resultado de un incremento de los niveles periféricos de hormonas tiroideas a nivel plasmático.

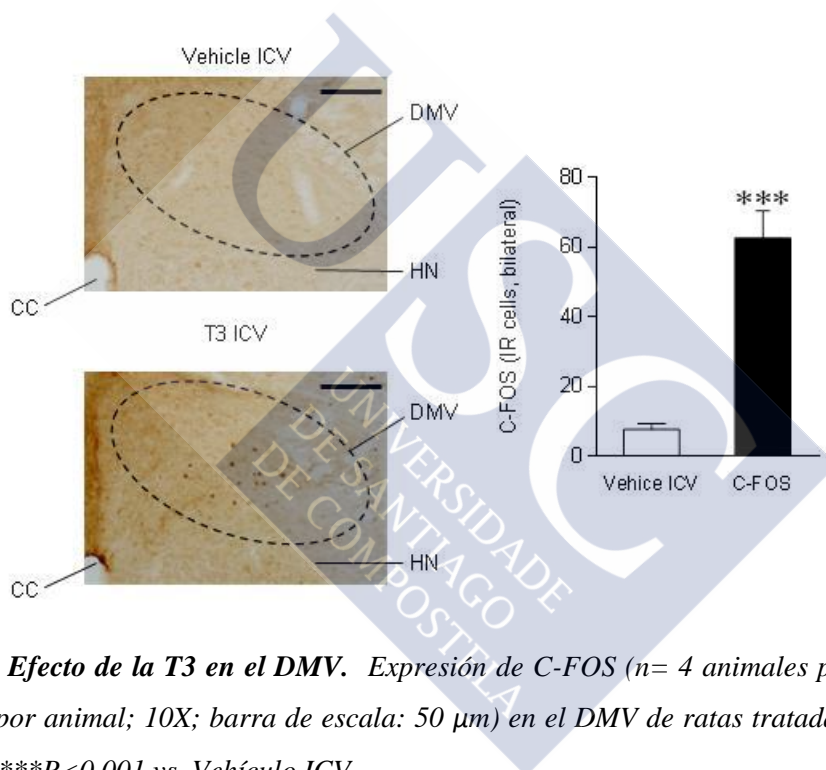
Estos datos se sustentan por la observación de que no se observaron cambios en la masa corporal ni en la ingesta, ni en la ruta de AMPK en hígado y BAT tras la administración IP de la misma dosis de T3 usada ICV, descartando una posible difusión de T3 desde el cerebro a la periferia (**Figura 7**).



**Figura 7. Efecto de la administración intraperitoneal de T3.** Niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado (panel izquierdo;  $n=10$  animales por grupo) y BAT (panel derecho;  $n=7$  animales por grupo) de ratas tratadas IP con T3 con la misma dosis usada ICV y sus controles.

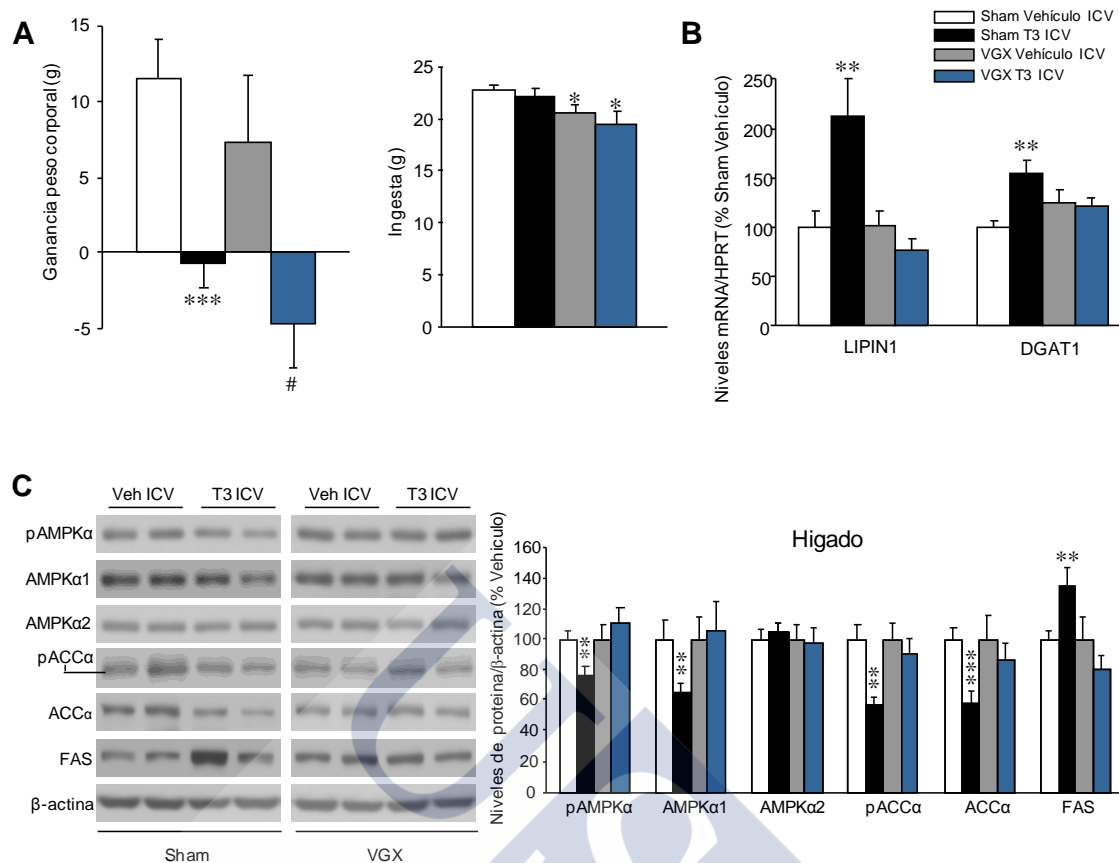
**El PSNS media las acciones centrales de T3 en la lipogénesis de novo en el hígado.**

A continuación investigamos si la regulación del metabolismo lipídico en hígado y BAT tras la administración de T3 estaba mediada por el ANS. Primero, analizamos la activación del núcleo dorsal del nervio vago (DMV), un sitio clave que da lugar a las fibras parasimpáticas del nervio vago que inervan el hígado (Fliers et al., 2010a); observamos un incremento en la expresión de C-FOS en el DMV tras la administración de T3 (**Figura 8**).



**Figura 8. Efecto de la T3 en el DMV.** Expresión de C-FOS ( $n= 4$  animales por grupo, 9-32 secciones por animal; 10X; barra de escala: 50  $\mu$ m) en el DMV de ratas tratadas con T3 y sus controles. \*\*\* $P<0.001$  vs. Vehículo ICV.

Para comprobar si el efecto central de la T3 en el metabolismo lipídico involucraba una inervación vagal, administramos T3 a ratas previamente vagotomizadas y a sus controles (ratas *sham*). Observamos que la administración ICV de T3, provocaba un descenso en la masa corporal en las ratas *sham* y VGX (**Figura 9A**) (indicando que no hay implicación del nervio vago en la reducción de la masa corporal por la T3). Sin embargo, la vagotomía fue suficiente para eliminar el efecto inducido por las hormonas tiroideas en la ruta de AMPK hepática (**Figura 9C**), así como los niveles de expresión de mRNA de LIPIN1 y DGAT1 (**Figura 9B**), indicando que el nervio vago media el efecto central de las T3 en el metabolismo lipídico.

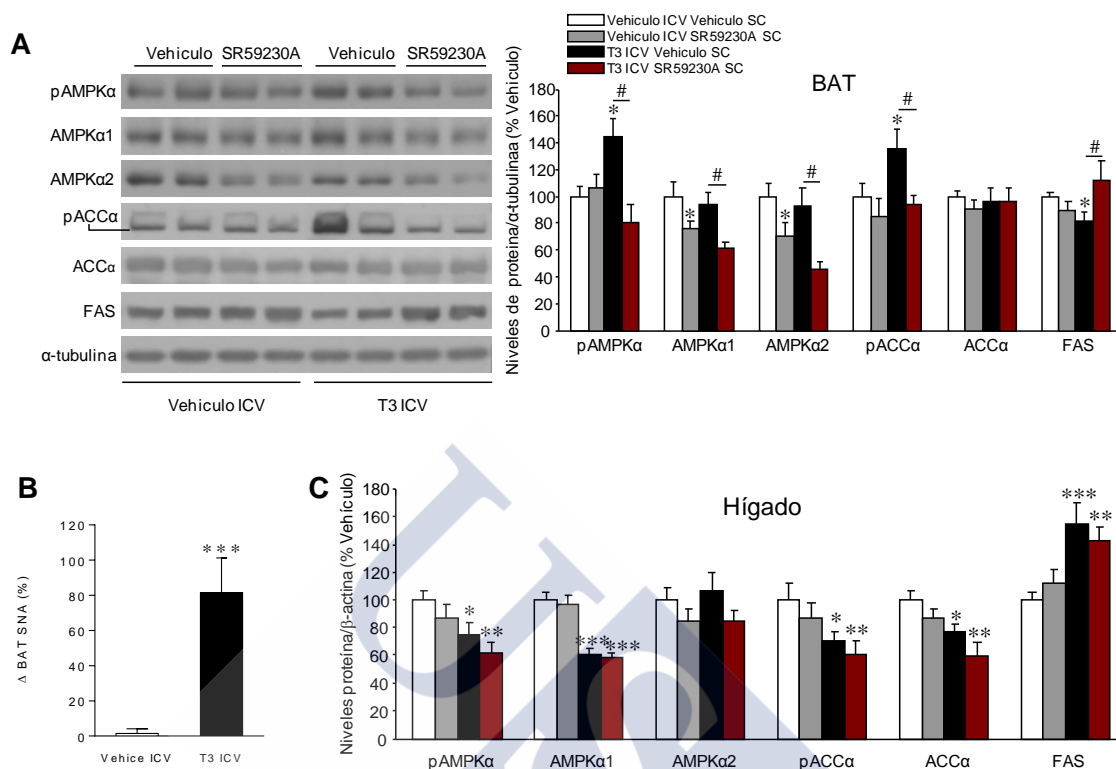


**Figura 9. Efecto de la vagotomía sobre el metabolismo de hígado y BAT en ratas tratadas con T3 ICV.** (A) Ganancia de masa corporal ( $n=13-14$  animales por grupo), ingesta ( $n=13-14$  por grupo), (B) niveles hepáticos de mRNA de LIPIN1 y DGAT1 ( $n=9$  animales por grupo) y (C) imágenes representativas de western blot (panel izquierdo) y niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado ( $n=11-14$  animales por grupo), de ratas vagotomizadas y ratas sham tratadas ICV con T3 y sus controles (Vehículo ICV) durante 5 días. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Vehículo ICV.

### El SNS media las acciones centrales de T3 en la lipogénesis de novo en el BAT.

La expresión de los marcadores termogénicos de BAT por efecto de la T3 a nivel central es mediado por el SNS a través de los receptores  $\beta$ 3-adrenérgicos (Lopez et al., 2010b). Investigamos si la regulación de la lipogénesis en BAT tras la administración central T3 estaba mediada por el SNS; de acuerdo a esto, observamos que la administración ICV de T3 incrementa el tráfico del nervio simpático en BAT registrado directamente por microneurografía (**Figura 10B**; datos generados por el Dr. Kamal Rahmouni; University of Iowa). Para comprobar esto, usamos un inhibidor farmacológico específico de los  $\beta$ 3-AR denominado SR59230A, administrado SC. Nuestros datos muestran que este antagonista bloquea la

inhibición de la lipogénesis de novo en BAT provocada por las hormonas tiroideas (**Figura 10A**); sin embargo no se produjeron cambios en la lipogénesis en el hígado (**Figura 10C**).

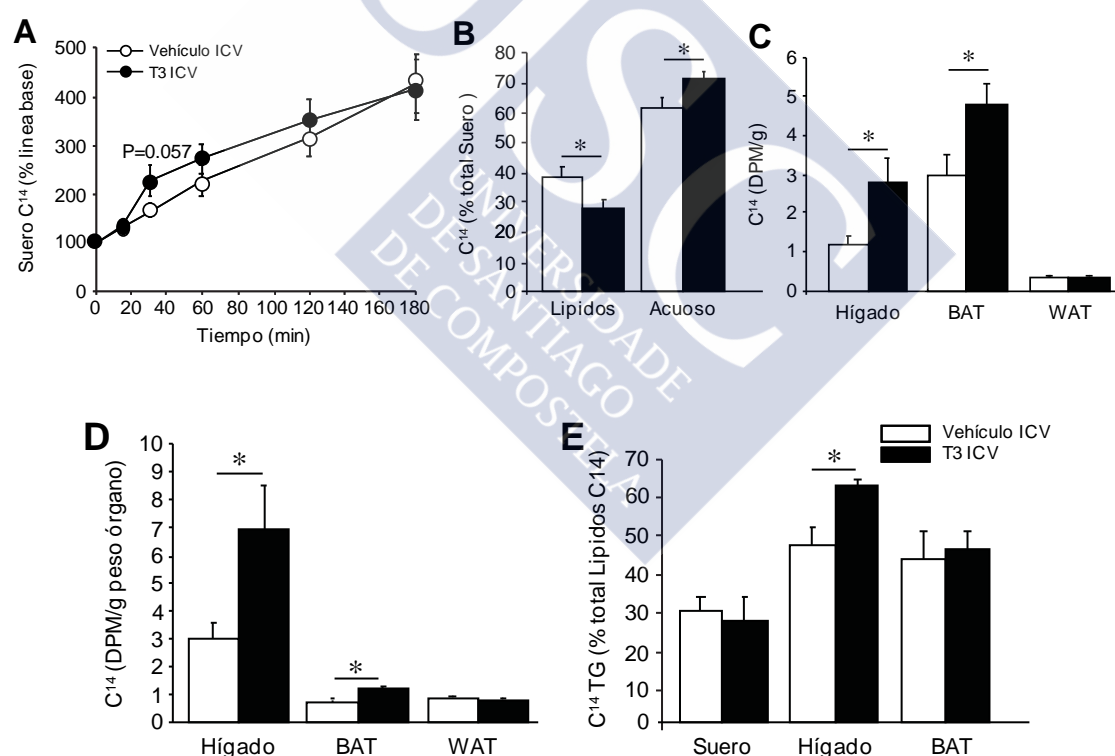


**Figura 10. Efecto de la inhibición farmacológica de los receptores  $\beta_3$ -AR sobre el metabolismo del hígado y BAT.** (A) Imágenes autorradiográficas representativas de western blot (panel izquierdo) y cuantificación de los niveles de proteína de la ruta de AMPK (panel derecho) en el BAT ( $n=7$  animales por grupo), (C) cuantificación de los niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado ( $n=7$  animales por grupo) de ratas tratadas subcutáneamente con SR59230A y con T3 ICV y sus controles (Vehículo ICV, Vehículo SC); (B) actividad simpática del BAT en ratas tratadas centralmente con T3 durante 5 días y sus controles (Vehículo ICV) ( $n=8-11$  animales por grupo). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Vehículo ICV. # $P<0.05$  T3 ICV Vehículo SC vs. T3 ICV SR59230A SC.

Estos datos indican que la T3 actúa en el CNS para regular la lipogénesis en el BAT (pero no en el hígado) vía incremento de la activación de los  $\beta_3$ -AR del SNS.

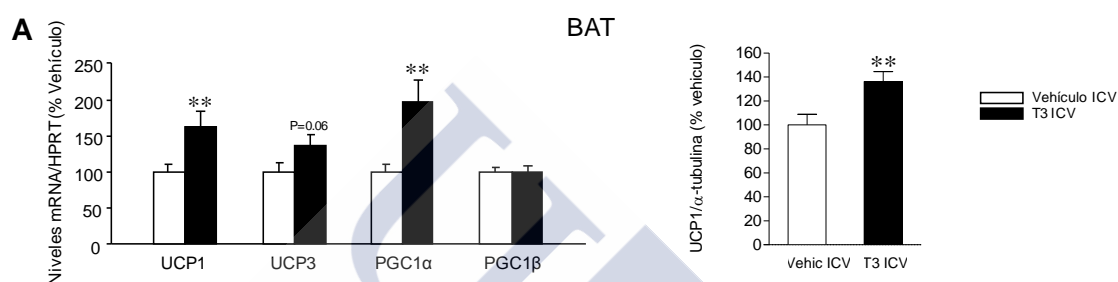
### **T3 a nivel central regula la captación de lípidos en BAT.**

Para observar si el incremento en la lipogénesis hepática tenía un impacto en la captación de ácidos grasos en tejidos periféricos, las ratas fueron pre-tratadas con oleato- $C^{14}$  antes del tratamiento con T3. Los análisis de suero revelan una acumulación de  $C^{14}$  más rápida en las ratas tratadas, siendo más abundante el marcador radioactivo en la fase acuosa que en la fase lipídica (**Figura 11B**). Esto sugiere que la eliminación desde el suero estaba incrementada junto con una elevada beta-oxidación de lípidos, impulsando metabolitos solubles como las cetonas o  $CO_2$  dentro de la circulación. En respuesta a la administración central de T3, el hígado y el BAT incrementan la captación. Por gramo de tejido, el BAT tiene el ratio de captación más alto (**Figura 11C**). Sin embargo, cuando corregimos el valor por la masa total del órgano el hígado tiene una contribución mayor a la contribución total de lípidos (**Figura 11E**). El hígado mostró un incremento significativo de TG marcado con  $C^{14}$ , indicando (en concordancia con los datos de la ruta de AMPK, LIPIN1 y DGAT1) (**Figura 5C-D**) que los ácidos grasos estaban siendo incorporados en los TG recién sintetizados.



**Figura 11. . Efecto de la T3 central en el metabolismo lipídico periférico.** Niveles de  $C^{14}$  en suero como (A) porcentaje de línea base y (B) en fase acuosa y fase lipídica de ratas tratadas ICV con T3 o su vehículo. (C) Contenido total de  $C^{14}$ , (D) contenido total de  $C^{14}$  corregido por masa de tejido/órgano en el hígado, BAT y WAT y (E) contenido de TG  $C^{14}$  en suero, hígado y BAT de ratas tratadas ICV con T3 y su vehículo durante 3 horas ( $n=9$  animales por grupo para todos los análisis). \* $P<0.05$ , vs. Vehículo ICV.

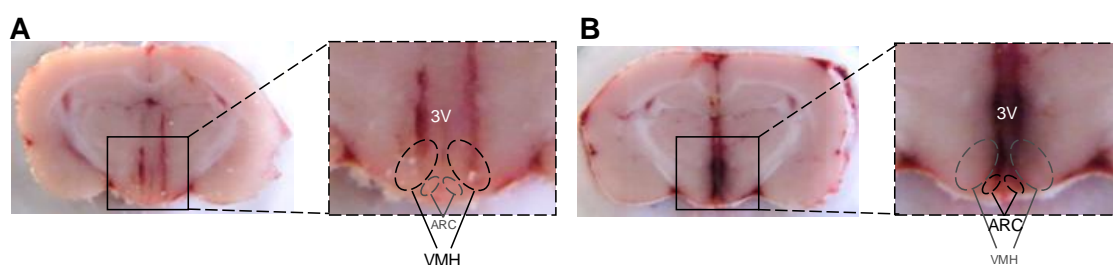
En general estos datos apoyan el efecto central de la T3 en el metabolismo lipídico hepático que conducen a un incremento en la síntesis de TG. En contraste, la reducción del programa lipogénico en BAT (incremento en pAMPK y pACC, ningún cambio en LIPIN1 y DGAT1) y la falta de un incremento en la incorporación de TG marcados con C<sup>14</sup>, junto con el aumento de la expresión de genes termogénicos (**Figura 12A**) (Lopez et al., 2010b) sugieren que los lípidos absorbidos por el BAT están actuando como combustible para la termogénesis. Sin embargo, no se observó acumulación de C<sup>14</sup> en WAT después de la administración central de T3 en ratas infundidas con oleato-C<sup>14</sup>, indicando que este tratamiento no tuvo efecto en el almacenamiento de energía (**Figura 11C-D**).



**Figura 12. Efecto de la T3 central en el metabolismo lipídico periférico.** (A) Cuantificación de los niveles de mRNA de marcadores termogénicos ( $n=8-10$  animales por grupo) y niveles proteicos de UCP1 ( $n=7$  animales por grupo) en BAT de ratas tratadas ICV con T3 y sus controles (Vehículo ICV). \*\* $P<0.01$  vs. Vehículo ICV.

### **T3 en el VMH regula la ruta de la lipogénesis de novo en hígado y BAT.**

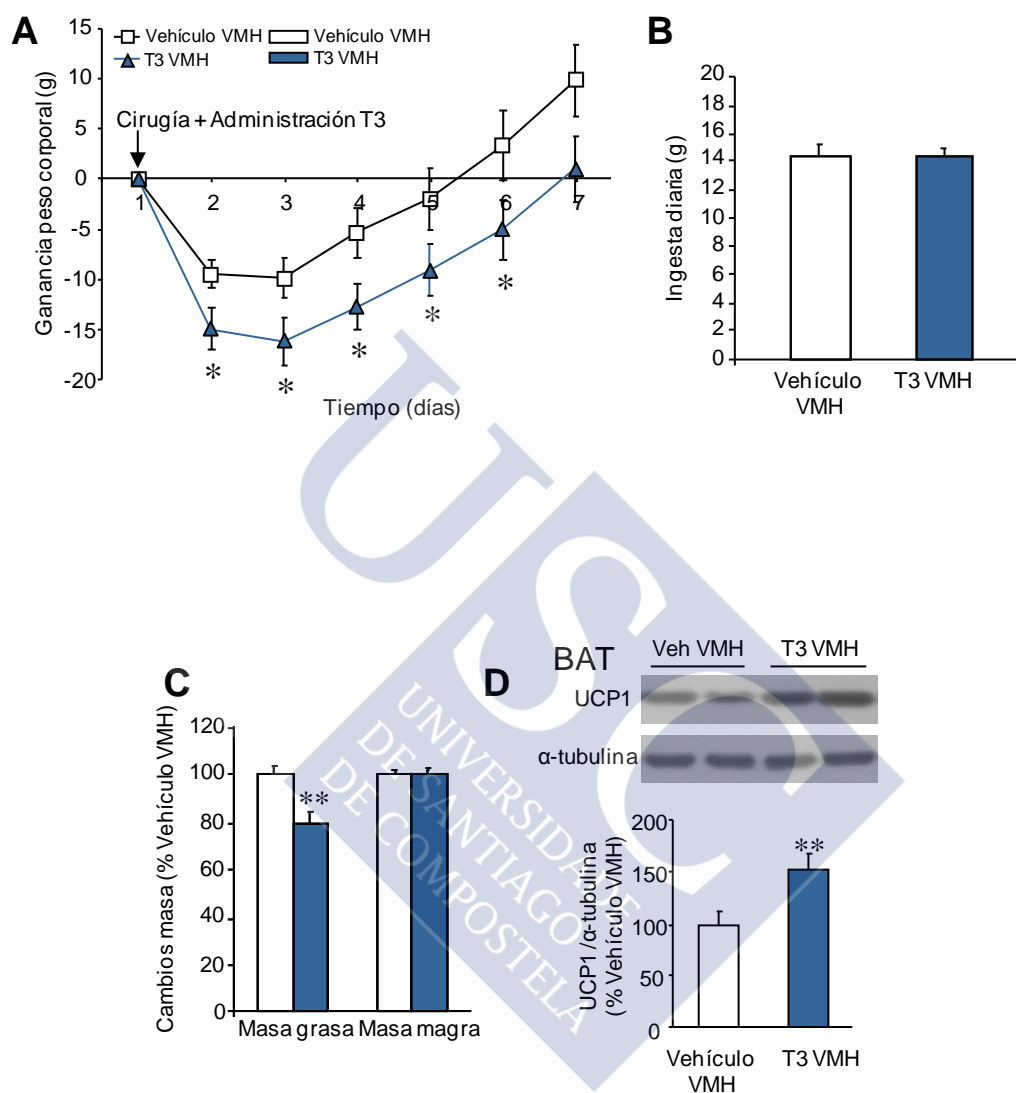
El siguiente objetivo de nuestro estudio fue identificar el núcleo hipotalámico donde las hormonas tiroideas ejercen su acción en el metabolismo lipídico periférico. Así, administramos estereotáxicamente T3 dentro del VMH y del ARC con la ayuda de cánulas nucleoespecíficas. La correcta posición de la cánula fue verificada mediante examinación histológica de secciones coronales del cerebro (**Figura 13**).



**Figura 13. Imágenes histológicas de secciones coronales del cerebro de ratas mostrando la localización de las cánulas nucleoespecíficas en el VMH (A) y el ARC (B).**

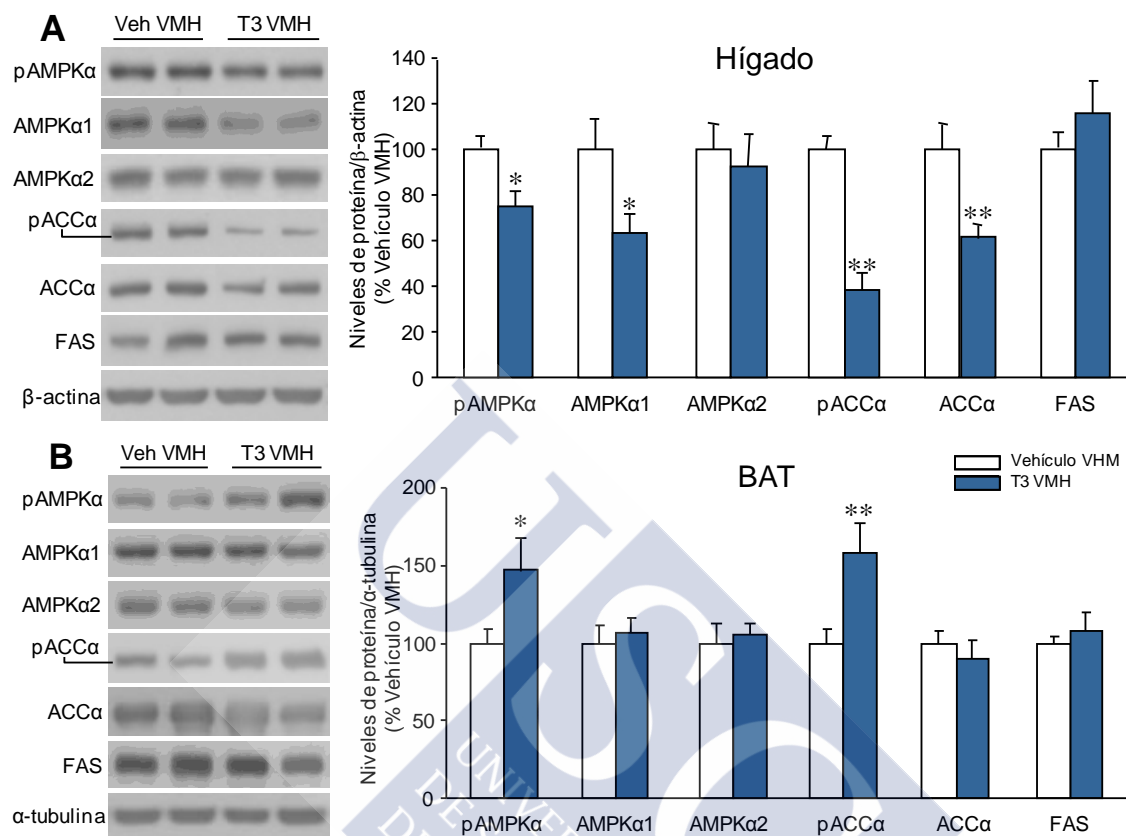


Tras la administración en el VMH, observamos que la T3 promueve una pérdida de masa (**Figura 14A**) independiente de la ingesta (**Figura 14B**) y se observa una reducción en la adiposidad sin cambios en la masa magra (**Figura 14C**) en asociación con un incremento de los niveles proteicos de UCP1 en el BAT (**Figura 14D**).



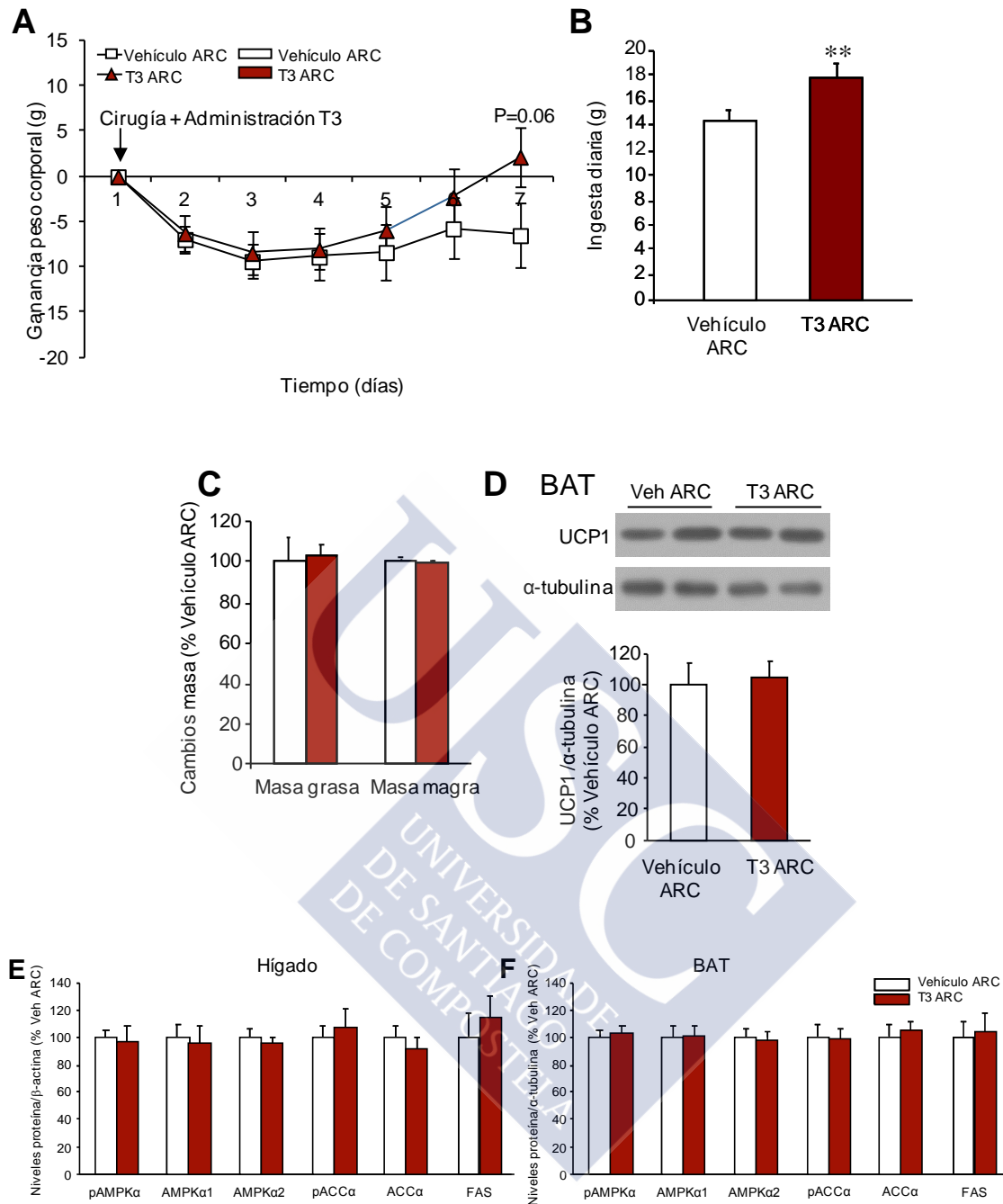
**Figura 14. Efecto de la administración crónica de T3 en el VMH.** (A) Ganancia de masa corporal ( $n= 16-17$  animales por grupo), (B) ingesta ( $n= 16-17$  animales por grupo), (C) cambios en la masa corporal ( $n=6-7$  animales por grupo) y (D) imágenes representativas autorradiográficas (panel superior) y cuantificación de los niveles de UCP1 (panel inferior) ( $n=14$  animales por grupo) en BAT, en ratas que recibieron T3 en el VMH y sus controles (Vehículo VMH). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs vehículo VMH.

En relación a la ruta de señalización de AMPK en hígado y BAT, nuestros datos muestran que la administración de T3 en el VMH induce un descenso de pACC y pAMPK en el hígado mientras en el BAT el efecto es el contrario (**Figura 15A-B**)



**Figura 15. Efecto de la administración crónica de T3 en el VMH en el metabolismo periférico.** (A-B) Imágenes representativas autorradiográficas de western blot (panel izquierdo) y cuantificación de niveles de proteína de la ruta de AMPK (panel derecho) en hígado (A) ( $n=14$  animales por grupo) y BAT (B) ( $n=14$  animales por grupo), de ratas tratadas crónicamente con T3 en el VMH y sus controles (Vehículo VMH). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs vehículo VMH.

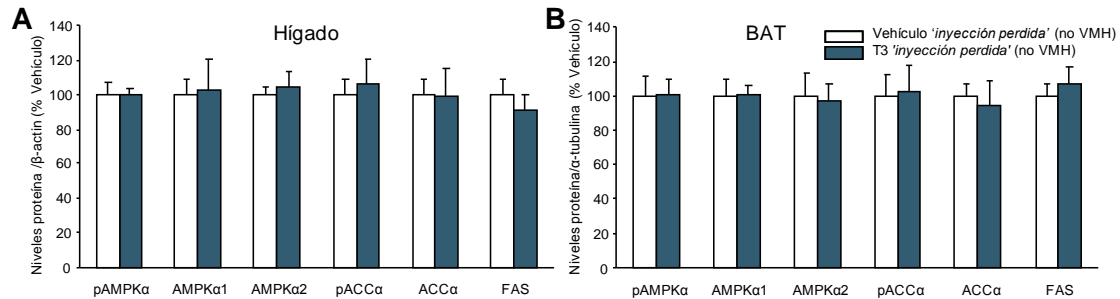
Sin embargo, cuando administramos T3 en el ARC observamos una leve tendencia a incrementar la masa corporal al final del tratamiento en asociación con un incremento en la ingesta (**Figura 16A-B**) y sin cambios en la adiposidad (**Figura 16C**), la masa magra o los niveles de UCP1 (**Figura 16D**). Tampoco se observaron cambios en el programa lipogénico del BAT y el hígado (**Figura 16E-F**). Esto indica que las acciones centrales de la T3 en el metabolismo lipídico son núcleo-específicas y originadas en el VMH.



**Figura 16. Efecto de la administración crónica en el ARC de T3.** (A) Ganancia de masa corporal ( $n= 16-17$  animales por grupo), (B) ingesta ( $n= 16-17$  animales por grupo), (C) cambios en la masa corporal ( $n=6-7$  animales por grupo), (D) imágenes representativas autorradiográficas (panel superior) y cuantificación de los niveles de UCP1 (panel inferior) ( $n=14$  animales por grupo) en BAT, y (E-F) cuantificación de niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado (E) ( $n=14$  animales por grupo) y BAT (F) ( $n=14$  animales por grupo), en ratas que recibieron crónicamente T3 en el VMH y sus controles (Vehículo ARC). \*\* $P<0.01$  vs Vehículo ARC.

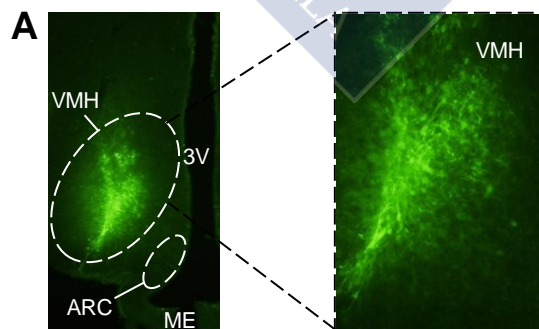
## Resultados

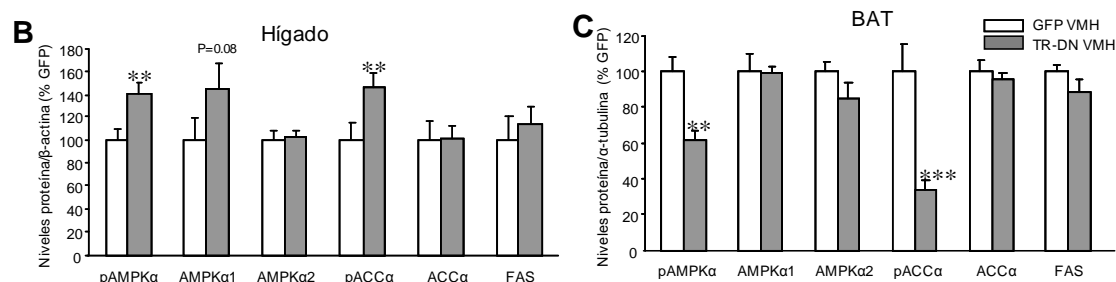
Para marcar mejor la especificidad de la inyección en el VMH, administramos T3 en áreas próximas y circundantes al VMH; bajo estas condiciones no observamos cambios en la ruta de AMPK en hígado y BAT (**Figura 17**).



**Figura 17. Efecto de la administración de T3 en áreas próximas al VMH.** (A) Cuantificación de niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado ( $n=7$  animales por grupo) y (B) cuantificación de niveles de proteína de la ruta de AMPK en BAT ( $n=7$  animales por grupo), en ratas que recibieron T3 en regiones próximas al VMH y sus controles (Vehículo).

Cuando el receptor de hormonas tiroideas es abolido en el VMH de ratas eutiroides mediante la inserción estereotáxica de una isoforma dominante negativa del receptor de hormonas tiroideas (TR-DN), observamos que se ejerce un efecto contrario en la lipogénesis en hígado y BAT de lo detectado tras la administración de T3 en este núcleo (incremento de la ruta de AMPK en hígado y descenso en BAT) (**Figura 18B-C**). Estos adenovirus fueron previamente validados (Lopez et al., 2010b) y la eficiencia de la infección fue demostrada mediante la expresión de GFP en el VMH (**Figura 18A**).





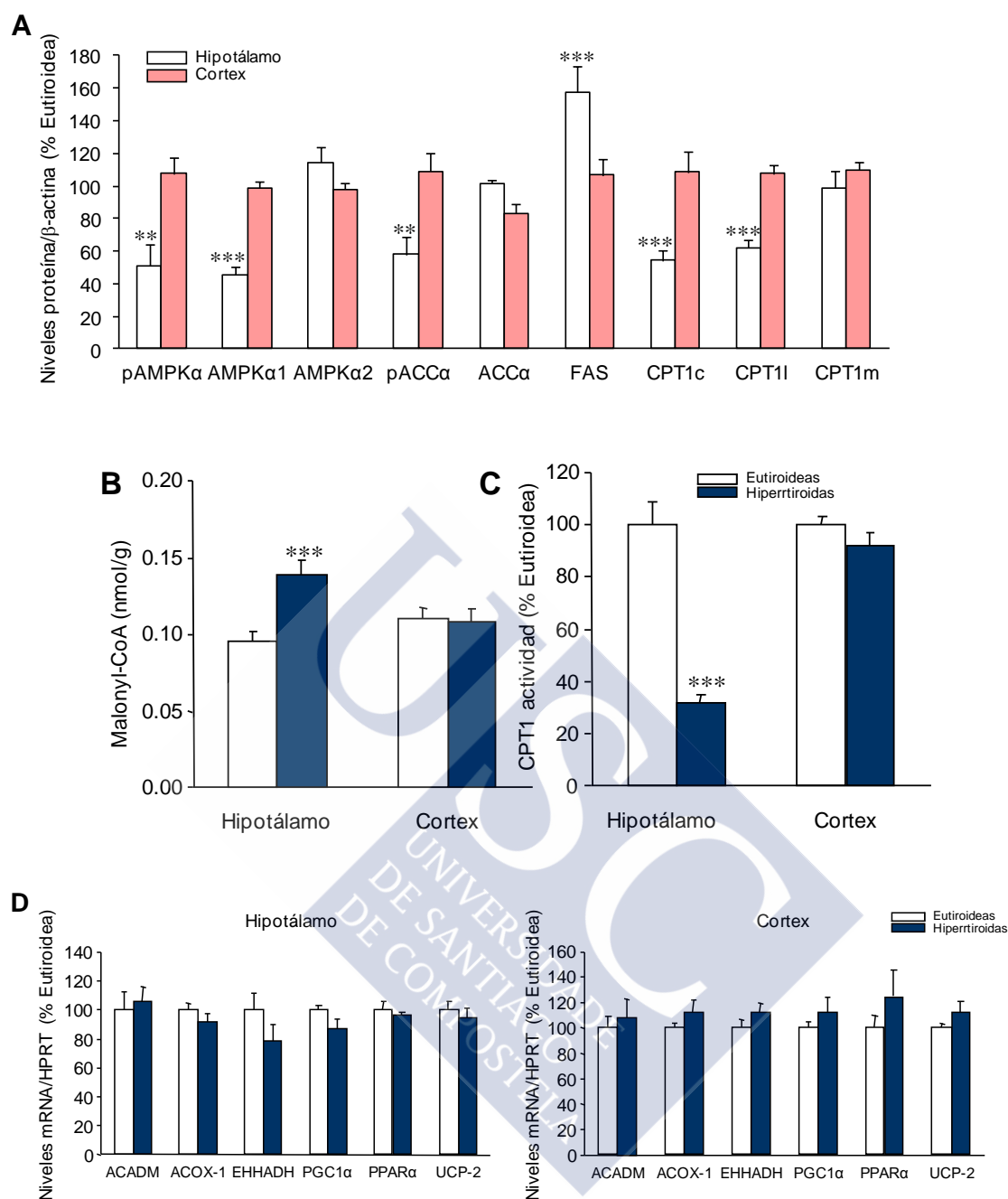
**Figura 18.** (A) Imágenes de inmunofluorescencia representativas (izquierda: 4X, derecha: 20X) con anticuerpo anti-GFP mostrando la expresión de GFP en el VMH de ratas tratadas con adenovirus dentro del VMH. (3V: tercer ventrículo). (B-C) Cuantificación de niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado (B) ( $n=7$  animales por grupo) y en BAT (C) ( $n=7$  animales por grupo), en ratas que recibieron estereotáxicamente en el VMH un adenovirus TR-DN o GFP durante 5 días. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. GFP VMH.

Estos datos refuerzan el concepto de que la acción de la T3 en el metabolismo lipídico periférico es núcleo específica del VMH, y que sus acciones son opuestas a nivel hepático y del BAT a través de los TRs.

### Los efectos centrales de la T3 en la lipogénesis *de novo* en hígado y BAT dependen de AMPK en el VMH.

Luego investigamos los mecanismos centrales concretos que conducen a la modulación de la lipogénesis en estos tejidos tras la administración central de T3. El hipertiroidismo, la administración central de T3 y la administración de T3 en el VMH producen la activación hipotalámica de la lipogénesis *de novo* (Lopez et al., 2010b; Varela et al., 2012) asociado con un incremento en el programa termogénico en BAT a través del SNS. Nuestros datos confirman que es específico del hipotálamo y no extensible a otras áreas del cerebro como el cortex (Figura 19A). De acuerdo con estos resultados, la concentración de malonil-CoA fue incrementada en el hipotálamo, pero no en el cortex, de ratas hipertiroideas (Figura 19B), mientras que la actividad de CPT1 muestra un patrón opuesto (Figura 19C). No se encontraron cambios en la expresión de otros genes de la oxidación lipídica entre hipotálamo y cortex (Figura 19D).

## Resultados

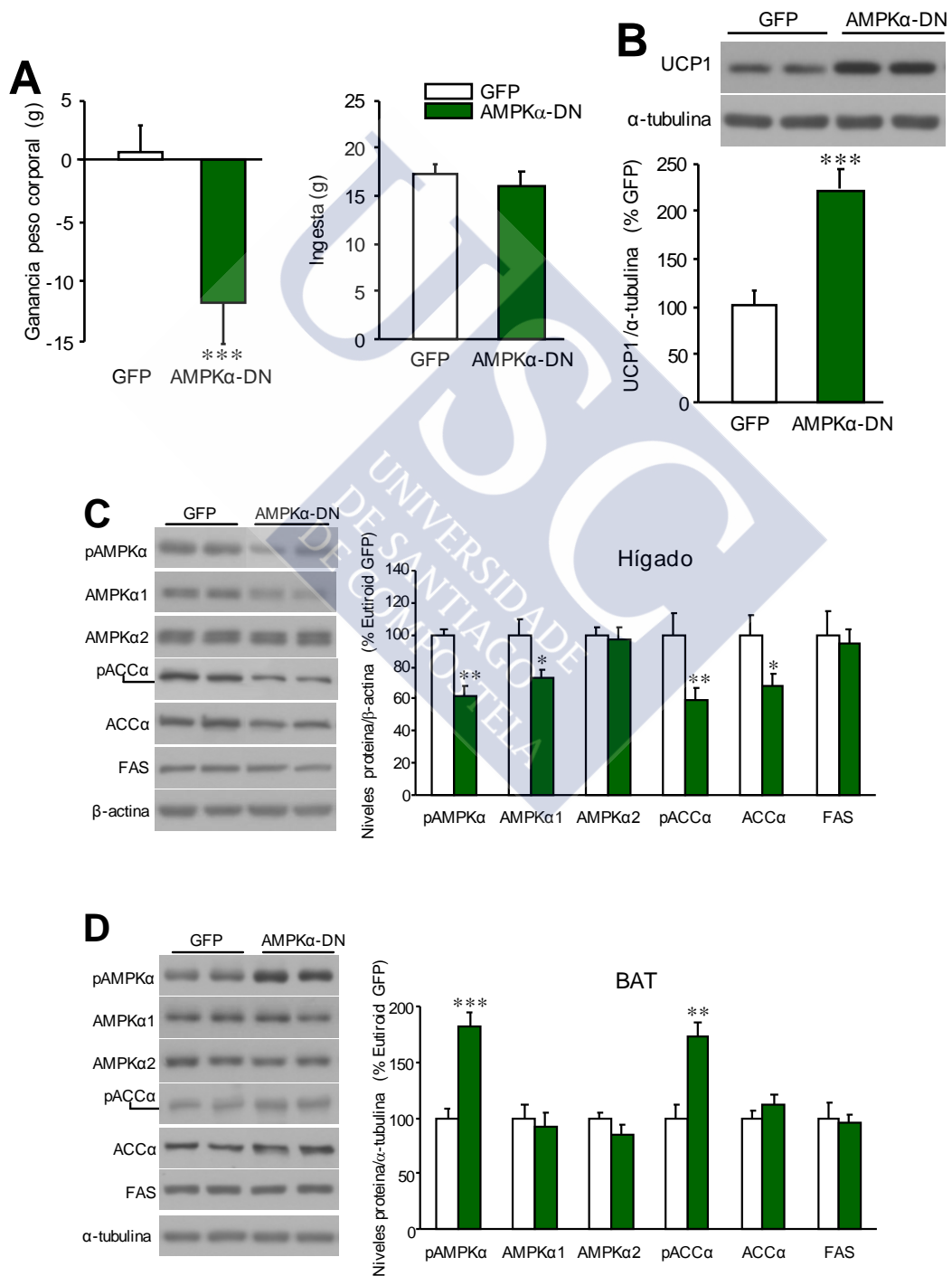


**Figura 19. Efecto de la administración central de T3 sobre diferentes áreas del cerebro.** (A) Cuantificación de los niveles de proteínas de la ruta de AMPK y de CPT1 ( $n=6-8$  animales por grupo), (B) concentración malonil-CoA ( $n=8-10$  animales por grupo), (C) actividad de CPT1 ( $n=6-10$  animales por grupo) y (D) niveles de mRNA de genes implicados en la oxidación lipídica ( $n=7-8$  animales por grupo) en el hipotálamo y el cortex de ratas hipertiroideas y eutiroides. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Eutiroides.

Para poder aclarar el papel de la actividad de AMPK en el hipotálamo en el programa lipogénico en hígado y BAT, administramos los adenovirus AMPKα-DN o GFP estereotáxicamente en el VMH de ratas eutiroides, como previamente validamos (Lopez et al.,

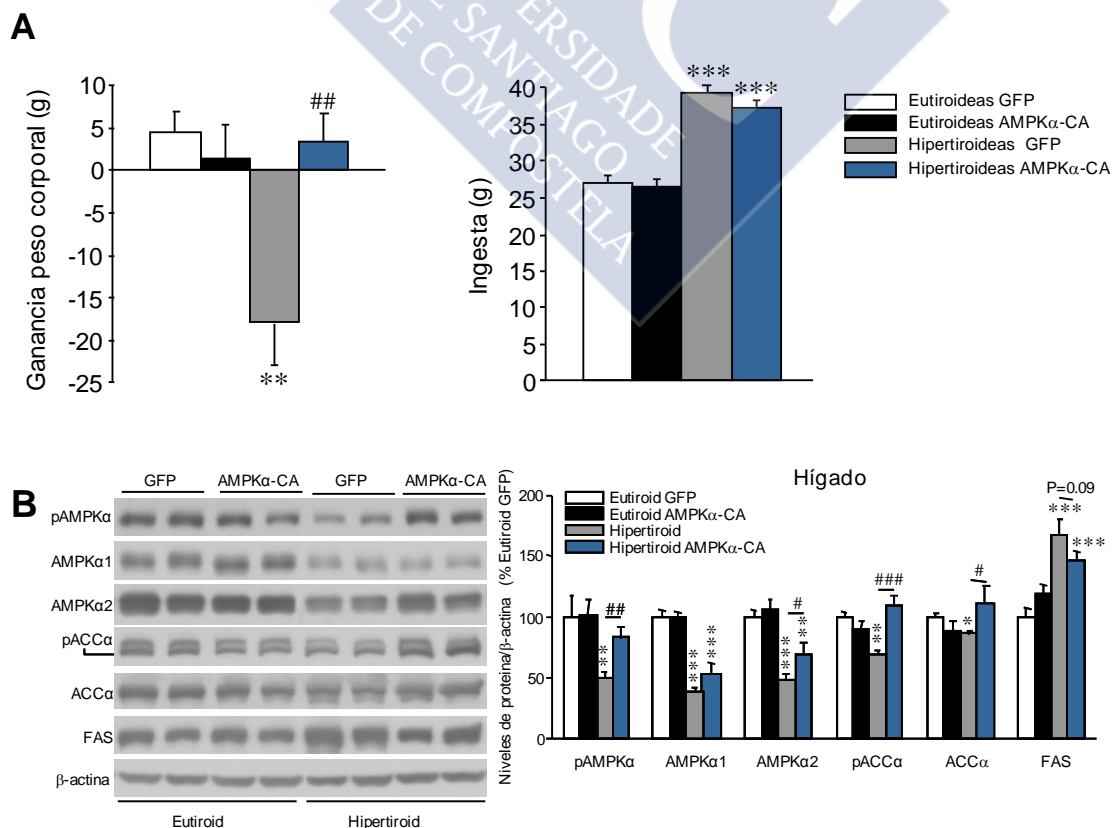
2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2014a). La eficiencia de la infección fue demostrada por la expresión de GFP en el VMH (**Figura 18A**).

Observamos que el tratamiento con adenovirus AMPK $\alpha$ -DN induce una pérdida de masa independiente de la ingesta y un incremento de los niveles de UCP1 en BAT (**Figura 20A-B**). La inhibición genética de AMPK $\alpha$  provoca los mismos efectos que la inyección de T3 en el VMH, inhibición de la señalización de AMPK en el hígado (**Figura 20C**) e incremento en el BAT (**Figura 20D**).

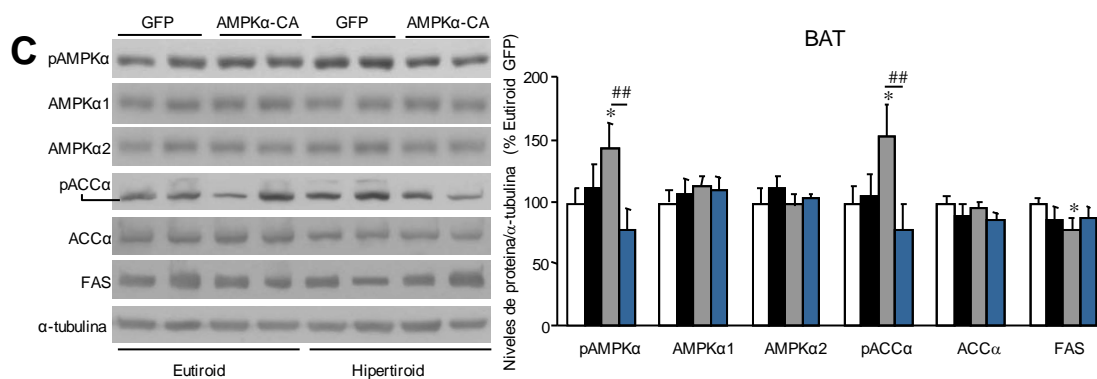


**Figura 20. Efecto de la inactivación de AMPK en el VMH sobre el metabolismo del hígado y del BAT.** (A) Ganancia de masa corporal ( $n= 23-25$  animales por grupo) y ingesta ( $n= 23-25$  animales por grupo), (B) imágenes representativas de western blot (panel superior) y cuantificación de los niveles de UCP1 en BAT ( $n=8$  animales por grupo), (C-D) imágenes representativas autorradiográficas (panel izquierdo) y cuantificación de los niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado (C) ( $n=12-13$  animales por grupo) y BAT (D) ( $n=12-13$  animales por grupo) de ratas eutiroides tratadas estereotáxicamente con AMPK $\alpha$ -DN en el VMH por 6 días y sus controles (GFP VMH). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. GFP VMH.

Siguiendo con esta hipótesis, quisimos ver si el efecto central de T3 en el metabolismo lipídico hepático y del BAT estaba mediado por la inhibición específica de AMPK en el VMH; para ello, inyectamos AMPK $\alpha$ -CA o GFP en el VMH de ratas hipertiroideas. Este adenovirus está previamente validado por nuestro grupo (Lopez et al., 2010b; Martinez de Morentin et al., 2014a; Whittle et al., 2012). La sobreexpresión de AMPK-CA en el VMH fue acompañada por una ganancia de masa en las ratas hipertiroideas pero no en las eutiroides ni hubo alteraciones en la alimentación (**Figura 21**). Esto estaba asociado con una reversión de los efectos inducidos por el hipertiroidismo en la ruta de la lipogénesis *de novo* en hígado (**Figura 21B**) y BAT (**Figura 21C**).





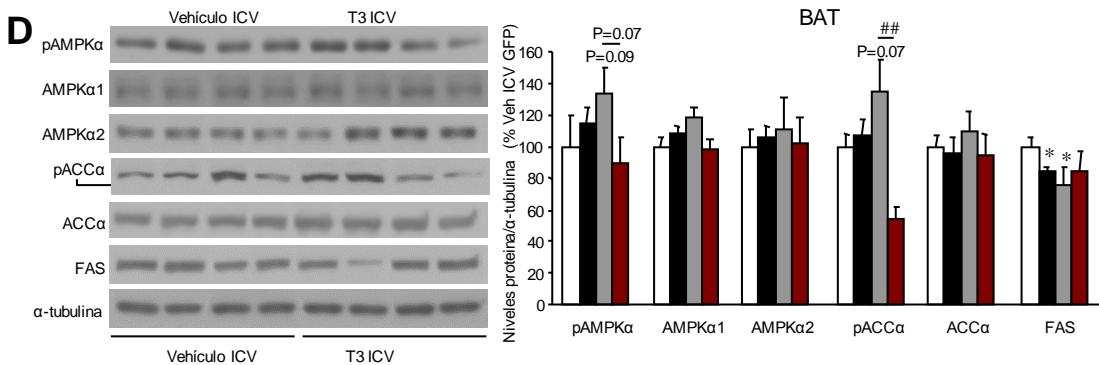
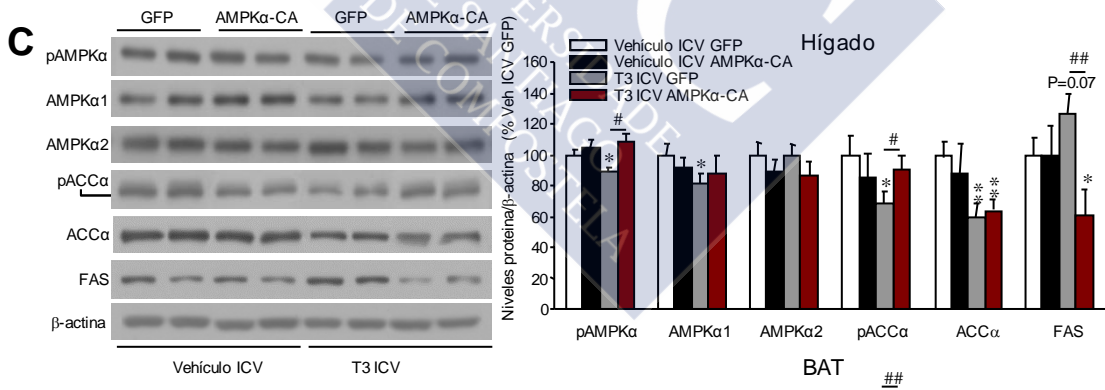
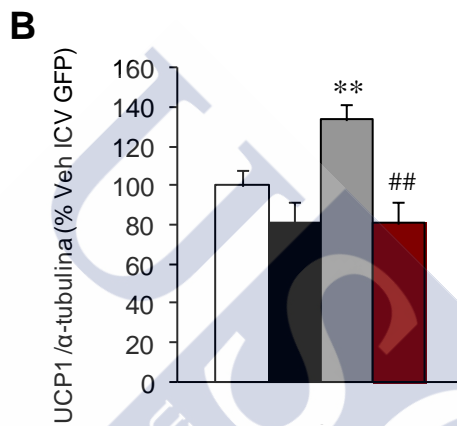
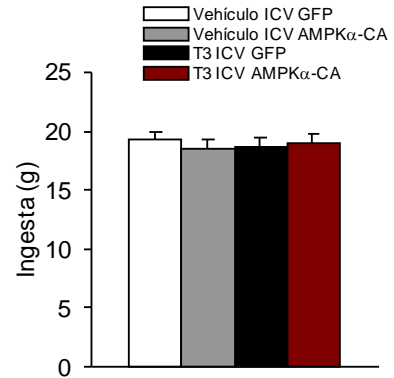
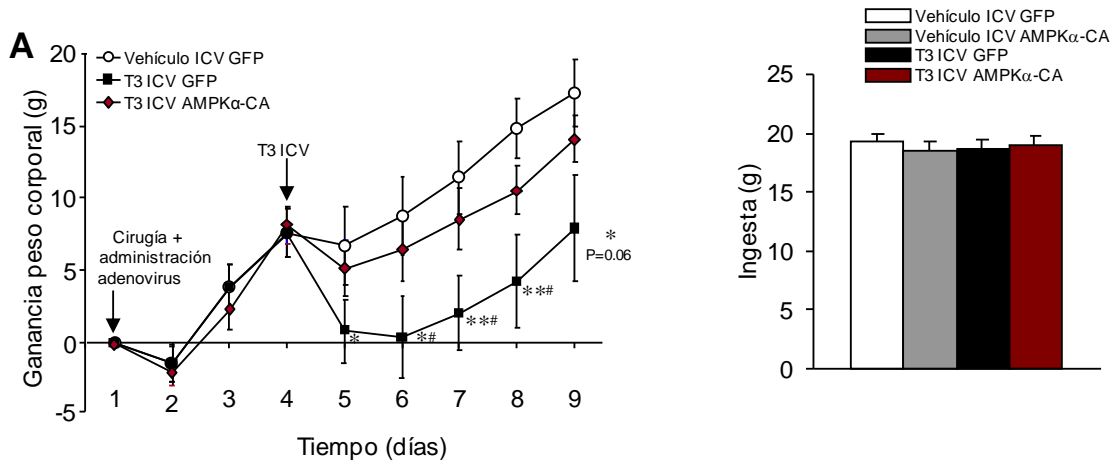


**Figura 21. Efecto de la activación de AMPK en el VMH de ratas hipertiroideas sobre el metabolismo del hígado y del BAT.** (A) Ganancia de masa corporal ( $n= 17-24$  animales por grupo) y ingesta ( $n= 17-24$  animales por grupo), (B-C) imágenes representativas autorradiográficas (panel izquierdo) y cuantificación de los niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado (B) ( $n=7$  animales por grupo) y BAT (C) ( $n=7$  animales por grupo) de ratas eutiroideas e hipertiroideas tratadas estereotáxicamente con AMPK $\alpha$ -CA en el VMH por 6 días y sus controles (eutiroideas GFP VMH). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Eutiroideas GFP VMH. # $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$  Hipertiroideas GFP vs Hipertiroideas AMPK $\alpha$ -CA

Estos datos indican que el descenso en la actividad de AMPK provocado por el hipertiroidismo en el VMH modula la lipogénesis *de novo* en hígado y BAT.

Siguiendo con esta hipótesis, los virus de AMPK $\alpha$ -CA fueron administrados en el VMH de ratas centralmente tratadas con T3. Los datos mostraron que la activación constitutiva de AMPK en el VMH revierte los efectos centrales de la T3 en la masa corporal independientemente de la ingesta (**Figura 22A**) y va asociado a un descenso en los niveles de UCP1 en BAT (**Figura 22B**). De igual modo que ocurría en el modelo hipertiroideo, se revierten los efectos centrales de T3 en la ruta de AMPK en el hígado (**Figura 22C**) y en el BAT (**Figura 22D**). Estos datos son coherentes con la hipótesis de que la reducción en la función de AMPK en el VMH, media los efectos de la TH a nivel central en el metabolismo lipídico del hígado y BAT.

## Resultados

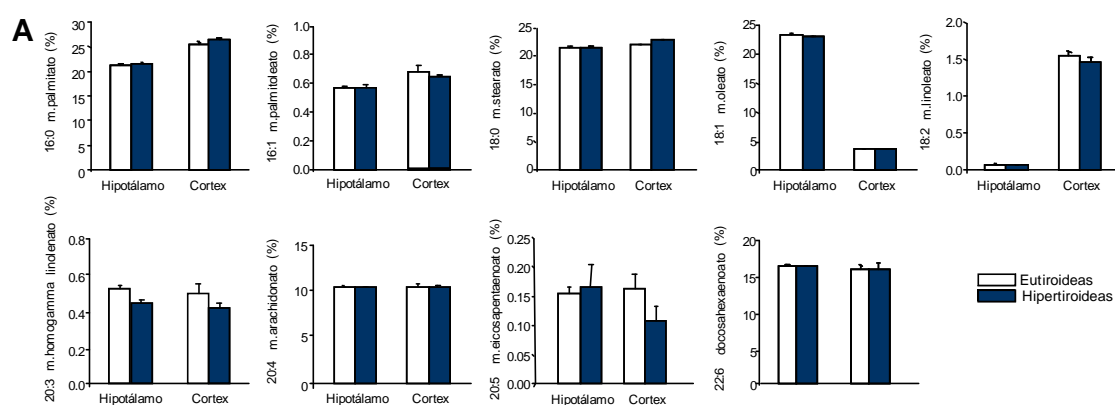


**Figura 22. Efecto de la activación de AMPK en el VMH sobre las acciones centrales de T3 en el metabolismo del hígado y del BAT.** (A) Ganancia de masa corporal ( $n= 17-19$  animales por grupo) y ingesta ( $n= 17-19$  animales por grupo), (B) niveles de UCP1 en BAT ( $n=7$  animales por grupo), (C-D) imágenes representativas autorradiográficas (panel izquierdo) y cuantificación de los niveles de proteína de la ruta de AMPK en hígado (C) ( $n=7$  animales por grupo) y BAT (D) ( $n=7$  animales por grupo) de ratas Vehículo ICV o T3 ICV tratadas estereotáxicamente con AMPK $\alpha$ -CA en el VMH por 6 días y sus controles (Vehículo ICV GFP VMH). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Vehículo ICV GFP VMH. # $P<0.05$ , ##  $P<0.01$ , ###  $P<0.001$  T3 ICV GFP vs T3 ICV AMPK $\alpha$ -CA.

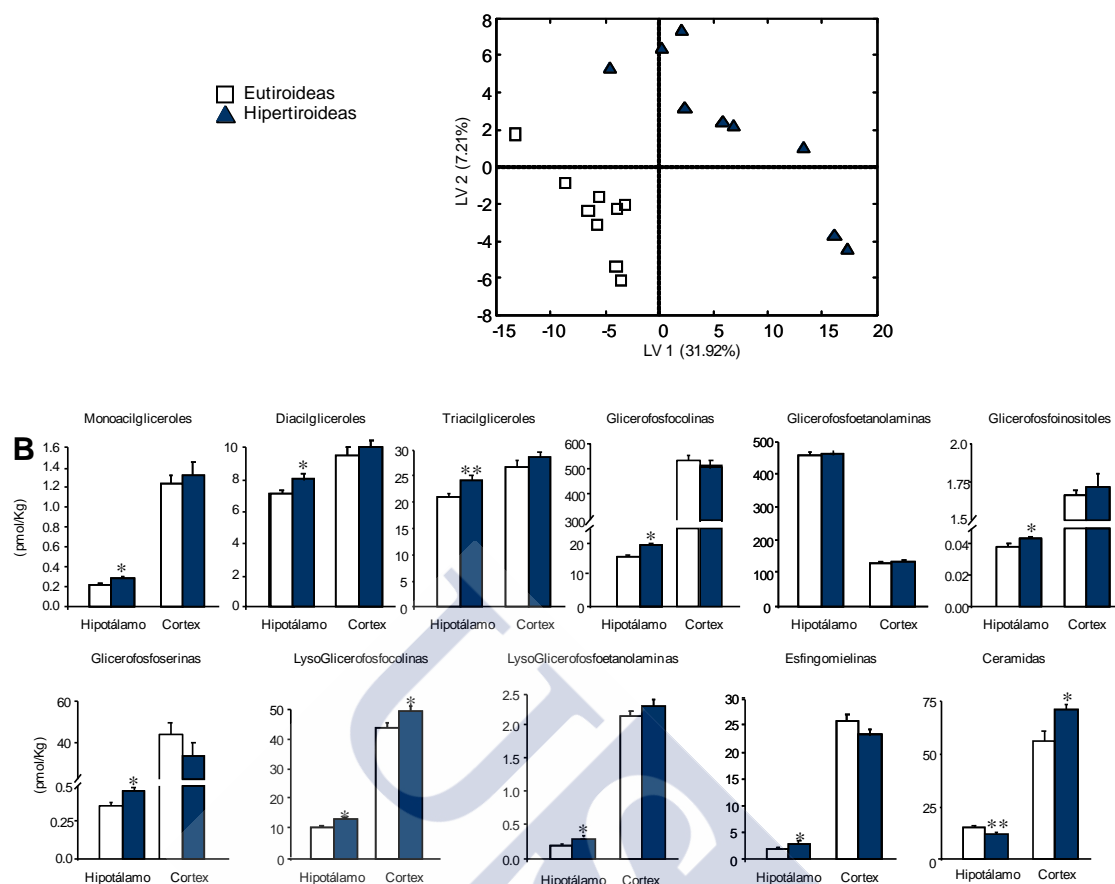
### Las hormonas tiroideas alteran la composición lipídica en el hipotálamo de rata, reduciendo los niveles de ceramidas.

Decidimos investigar los mecanismos moleculares implicados en la mediación de los efectos inducidos por TH en AMPK en el VMH sobre el metabolismo lipídico del hígado y del BAT.

Primero, barajamos la posibilidad del impacto de las TH en el metabolismo lipídico hipotalámico, debido a que AMPK es uno de los principales reguladores del metabolismo lipídico (Lage et al., 2008). Para ello evaluamos los niveles de varios ácidos grasos hipotalámicos (datos generados por el Dr. Matej Oresic; VTT, Finlandia) y observamos que a pesar de cambios en las enzimas de síntesis de ácidos grasos y malonil Co-A, no detectamos diferencias en ninguno de los ácidos grasos saturados e insaturados medidos en hipotálamo y cortex de ratas eutiroides (**Figura 23A**). Esta falta de cambios en el pool ácidos grasos hipotalámicos, sugiere la existencia de posibles cambios en la ruta del metabolismo de los lípidos complejos. Un análisis comparativo multivariado de estos datos nos muestra claras diferencias en el perfil lipídico en el hipotálamo (**Figura 23A**), pero no en el cortex (datos no mostrados).

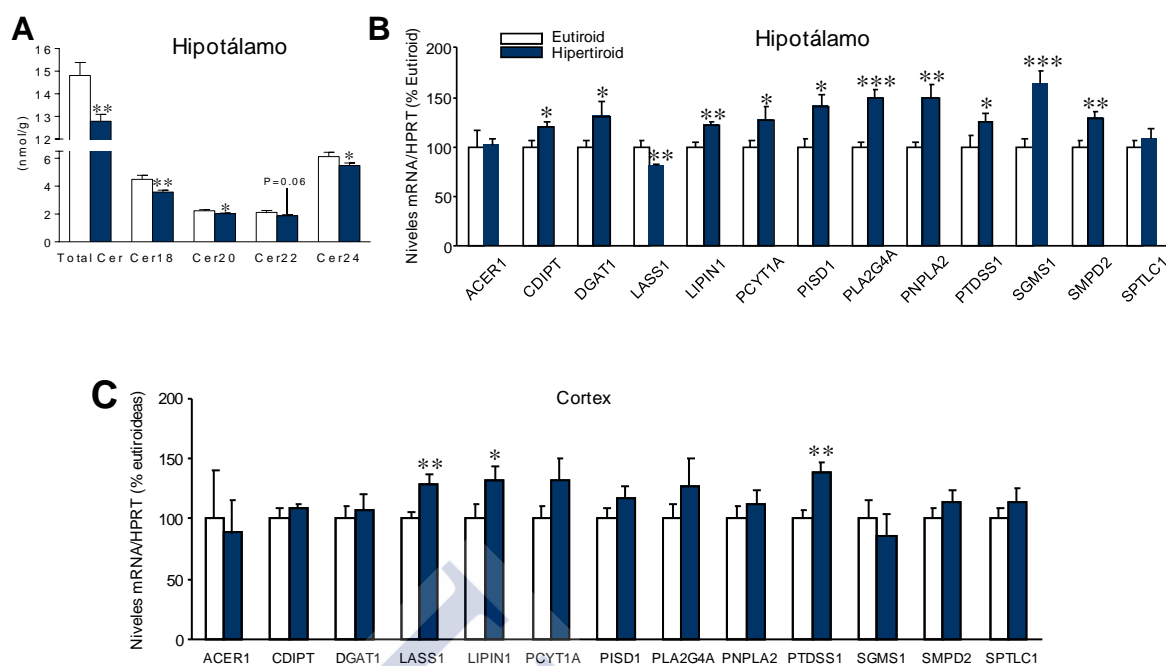


## Resultados



**Figura 23. Efecto de las hormonas tiroideas sobre la composición lipídica hipotalámica. (A)** Composición de ácidos grasos ( $n=9$  animales por grupo) y análisis comparativo multivariado ( $n=9$  animales por grupo), **(B)** niveles de especies lipídicas ( $n=9$  animales por grupo) en el hipotálamo y el cortex de ratas eutiroides e hipertiroideas. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs. Eutiroides.

El análisis de las diferentes especies lipídicas revela mayores cambios en el perfil lipídico hipotalámico de ratas hipertiroideas, gran parte debido a la acumulación de monoacilgliceroles (MAG), DAG, TG, glicerilfosforilcolina (glycerophosphocholine, GPCho), glicerofosfoinositoles (glycerophosphoinositols, GPI), glicerofosfoserinas (glycerophosphoserines, GPSer), lisoglicerofosfolinas (lysoglycerophosphocholines, LysoGPCho), lisoglicerofosfoetanolaminas (lysoglycerophosphoethanolamines, LysoGPETn) y esfingomielinas (sphingomyelins, SM) (Figura 23B). Opuesto a estos resultados, el contenido total de ceramidas estaba reducido en el hipotálamo e incrementado en el cortex de ratas hipertiroideas (Figura 23B). Un análisis de las distintas clases de ceramidas mostró que todas las especies de ceramidas analizadas estaban reducidas (Cer18, Cer20 y Cer22) o presentaban una tendencia a disminuir (Cer22) (Figura 24B).



**Figura 24. Efecto de las hormonas tiroideas sobre los niveles de ceramidas hipotalámicas y el ER estrés.** (A) Niveles hipotalámicos de ceramidas ( $n=9$  animales por grupo), (B-C) niveles de mRNA de enzimas implicadas el metabolismo de lípidos complejos ( $n=7-8$  animales por grupo) en el hipotálamo (B) y el cortex (C) de ratas eutiroides e hipertiroideas. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Eutiroides.

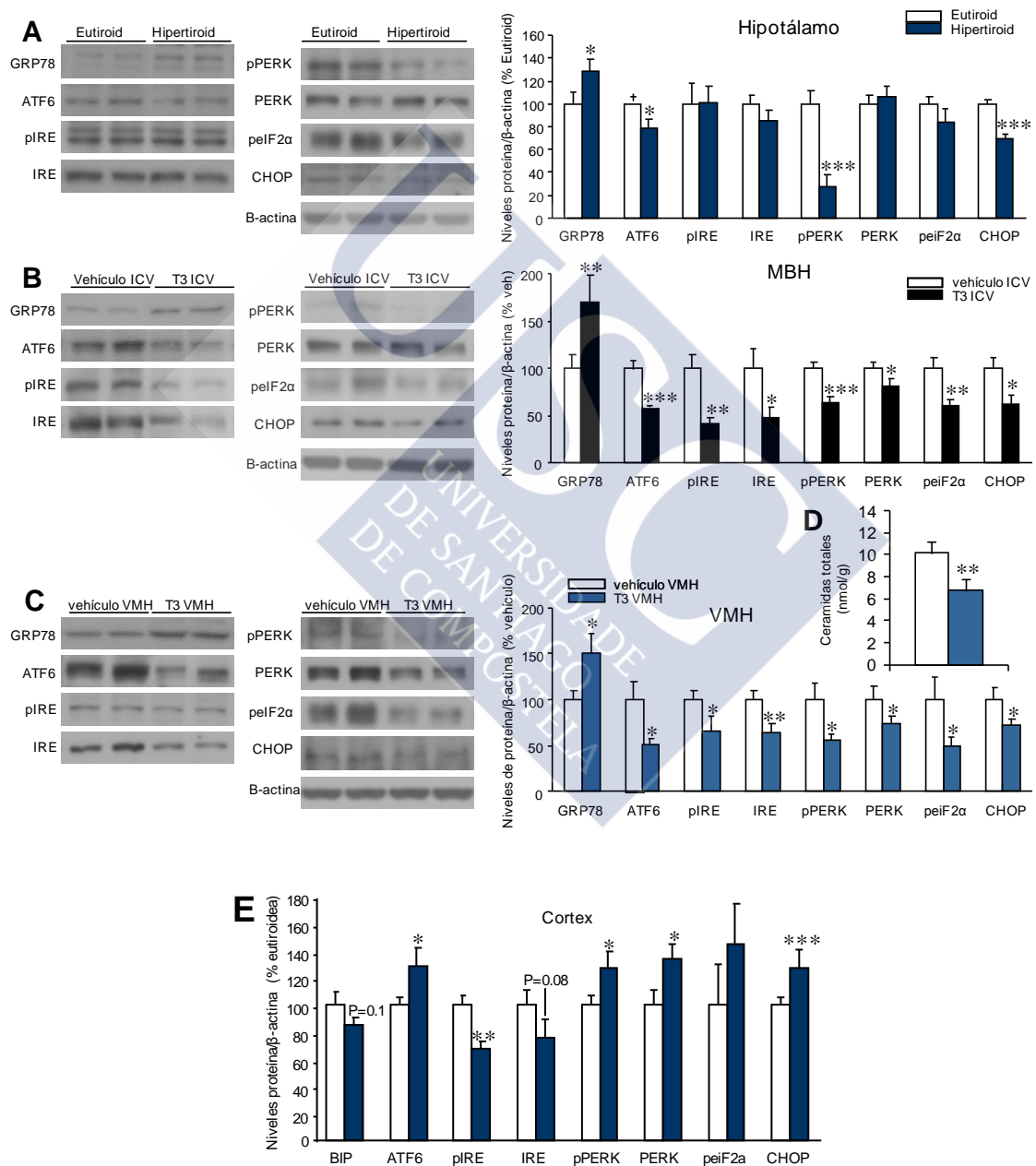
Al analizar la expresión de los genes de las enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos complejos, observamos que de un total de 11 enzimas analizadas, nueve de ellas estaban marcadamente sobre-expresadas en el hipotálamo (**Figura 24B**), pero no en el cortex de ratas hipertiroideas (**Figura 24C**). Sin embargo, las enzimas implicadas en el metabolismo de las ceramidas, estaban afectadas también por el estado hipertiroideo pero mostraban una reducción en los niveles de expresión las enzimas implicadas en la síntesis de ceramidas (LASS1 o CERS1) y una elevada expresión la esfingomielina sintasa 1 (sphingomyelin synthase 1 (SGMS1) (**Figura 24B**). Esto concuerda con la bajada en la concentración de ceramidas.

### **Las hormonas tiroideas reducen la lipotoxicidad hipotalámica inducida por ceramidas y el ER estrés.**

En tejidos periféricos la acumulación de especies reactivas lipídicas como las ceramidas, es un mecanismo patogénico de resistencia a insulina. Este proceso, conocido como lipotoxicidad, ocurre a través de la inflamación y el ER estrés (Turpin et al., 2014; Unger, 2002; Unger, 2003). Estudios recientes han demostrado que la lipotoxicidad inducida por ceramida provoca ER estrés conduciendo a una ganancia de masa corporal y un descenso en el tono simpático y en la

## Resultados

termogénesis en BAT (Contreras et al., 2014b). En base a esto, nosotros especulamos que la reducida concentración hipotalámica de ceramidas inducida por las hormonas tiroideas, podía tener impacto en el ER estrés y en los niveles de las proteínas UPR. Nuestros datos muestran que las ratas hipertiroides tienen los niveles de los marcadores de ER estrés ATF6, CHOP y pPERK reducidos en el hipotálamo. Por otra parte, los niveles de GRP78 estaban incrementados en el hipotálamo de ratas hipertiroides (**Figura 25A**). De igual forma las ratas tratadas con T3 a nivel central presentaban niveles reducidos de las proteínas de la ruta de UPR y un incremento en GRP78 en el hipotálamo medio-basal (MBH= VMH +ARC) (**Figura 25B**).



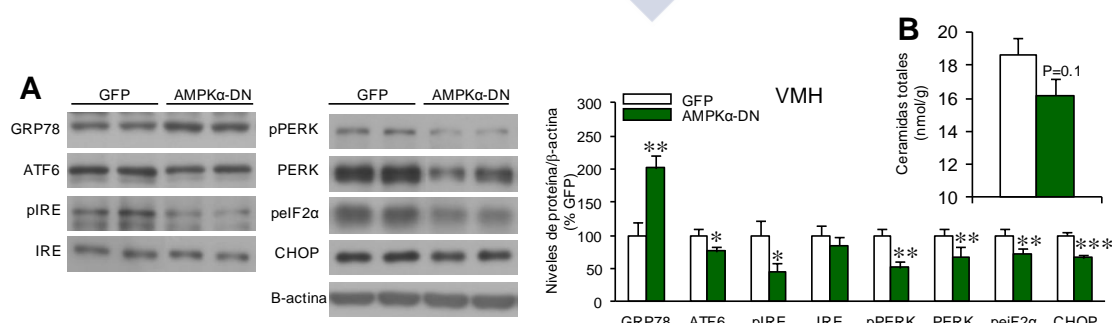
**Figura 25.** Efecto de las hormonas tiroideas sobre los niveles de ceramidas hipotalámicas y *ER* estrés. (A-D) Imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) y niveles de

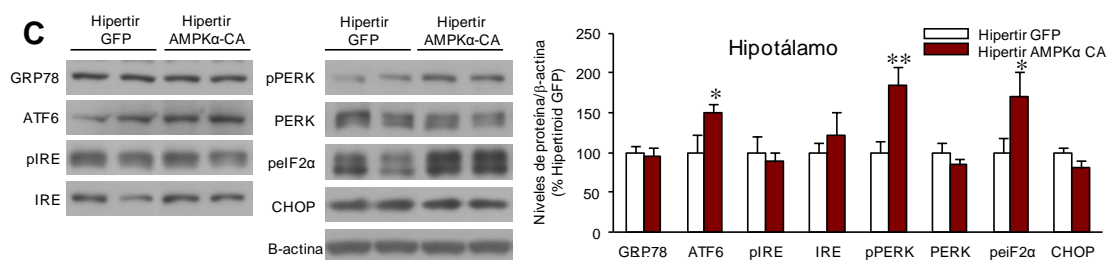
proteínas (panel derecho) de diferentes proteínas implicadas en la ruta de señalización del ER estrés en el hipotálamo de ratas hipertiroideas (A) ( $n=8-15$  animales por grupo), en el MBH de ratas tratadas con T3 ICV por 5 días (B) ( $n=7$  animales por grupo) y en el VMH de ratas tratadas estereotáxicamente con T3 en el VMH por 3 horas (C) ( $n=7$  animales por grupo). (D) Niveles totales de ceramidas en el MBH de ratas estereotáxicamente tratadas con vehículo o T3 en el VMH por 3 horas ( $n=9-10$  animales por grupo). (E) Niveles de proteína de diferentes proteínas implicadas en la ruta de señalización de ER estrés ( $n=7-8$  animales por grupo) en el cortex de ratas eutiroideas e hipertiroideas. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. Eutiroideas, Vehículo ICV, Vehículo VMH.

Finalmente, cuando la T3 fue administrada mediante estereotaxia en el VMH se observaron los mismos efectos en la ruta UPR y en GRP78 (Figura 25C), así como un descenso en la concentración de ceramidas en el VMH (Figura 25D).

Investigamos el mecanismo que media el efecto de la T3 en los niveles de ceramidas y ER estrés a nivel hipotalámico. Dado que observamos que la T3 disminuía la activación de AMPK en el hipotálamo (Lopez et al., 2010b) (Figura 19A), decidimos analizar la respuesta de las UPR y los niveles de ceramidas en ratas tratadas en el VMH con adenovirus AMPK $\alpha$ -DN en el núcleo. Obtuvimos el mismo patrón de respuesta: incremento de GRP78 y descenso de UPR, con una tendencia a bajar de la concentración de ceramidas (Figura 26A-B).

En base a esto, hipotetizamos que el efecto central de la T3 con ER estrés es mediado por la inhibición específica de AMPK en el VMH. Al tratar ratas hipertiroideas estereotáxicamente con AMPK $\alpha$ -CA en el VMH, vimos que la sobreexpresión de AMPK $\alpha$ -CA revertía la disminución de ER estrés inducido por el hipertiroidismo (Figura 26C).



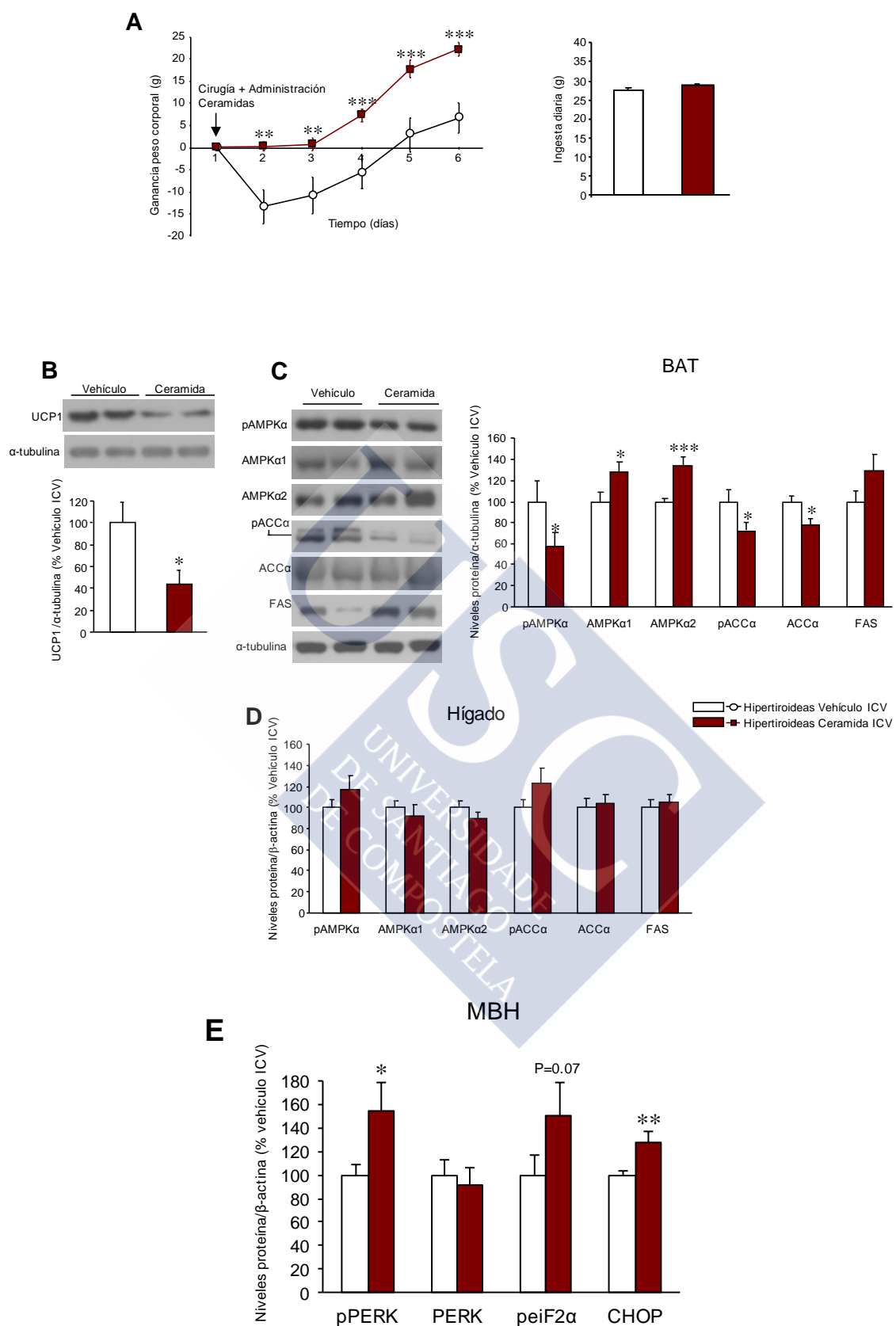


**Figura 26. Efecto de AMPK sobre los niveles de ceramidas hipotalámicas y el ER estrés.** (A-C) Imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) y niveles de proteínas (panel derecho) de diferentes proteínas implicadas en la ruta de señalización del ER estrés en el VMH de ratas tratadas con AMPK $\alpha$ -DN (A) ( $n=7$  animales por grupo) y en el hipotálamo de ratas tratadas con AMPK $\alpha$ -CA (C) ( $n=7$  animales por grupo), durante 6 días. (B) Niveles totales de ceramidas en el MBH de ratas estereotáxicamente tratadas AMPK $\alpha$ -DN ( $n=9$  animales por grupo). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  vs. GFP o Hipertiroideas GFP vs Hipertiroideas AMPK $\alpha$ -CA.

### Las ceramidas y la inducción de ER estrés revierten el efecto de la hormona tiroidea en la lipogenesis de novo y la termogénesis en BAT

Lo obtenido hasta ahora muestra que el descenso de la actividad de AMPK en el VMH provoca un descenso en los niveles de ceramidas así como un descenso de ER estrés. En base a esto, para investigar si los mecanismos que median las acciones centrales de las hormonas tiroideas en el metabolismo del hígado y BAT, tratamos ratas hipertiroideas ICV con C6 ceramida (ceramida penetrante en la célula que es convertida a ceramidas de cadena larga dentro de la célula (Contreras et al., 2014b)). La administración central de ceramida inducía una marcada ganancia de masa (**Figura 27A**), asociada a un incremento de ER estrés en el MBH (**Figura 27E**) y un descenso en los niveles de UCP1 y ruta de señalización en AMPK en el BAT (**Figura 27 B-C**). Estos datos demuestran que la administración central de ceramidas revierte el efecto central de T3 en el metabolismo de BAT. Sin embargo no hemos encontrado cambios en la ruta de AMPK en el hígado (**Figura 27D**), indicando que el efecto es específico del BAT.





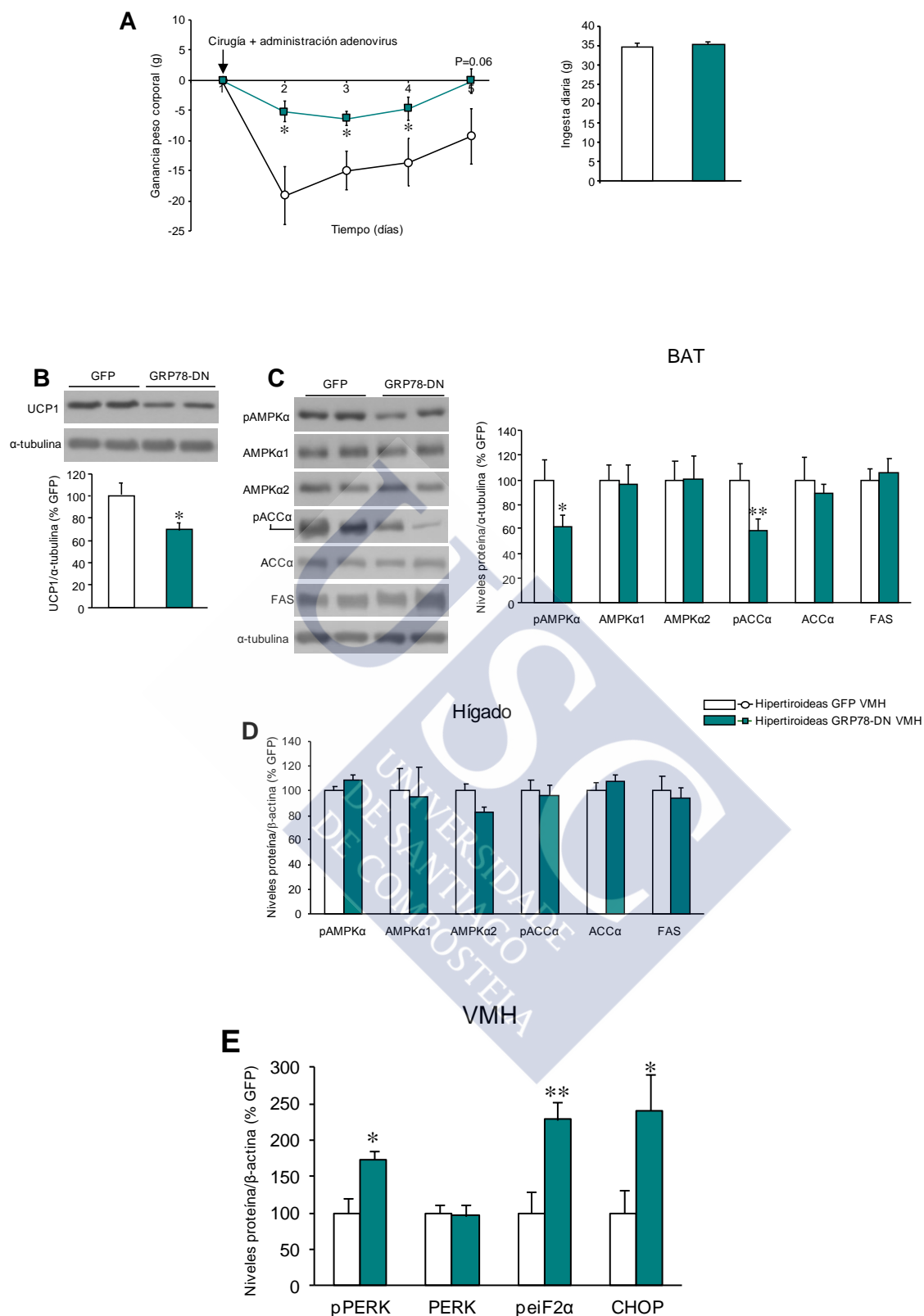
**Figura 27.** Efecto de las ceramidas sobre las acciones centrales de la T3 en el metabolismo periférico. (A) Ganancia de masa corporal e ingesta (n=9-10 animales por grupo), (B-E)

## Resultados

*imágenes autorradiográficas representativas de western blot (panel superior e izquierdo) y niveles proteicos (panel inferior o derecho) de UCP1 en BAT (B) (n= 7 animales por grupo), de la ruta de AMPK en BAT (C) (n= 7 animales por grupo), de la ruta de AMPK en hígado (D) (n=7 animales por grupo) y de la ruta de ER estrés en el MBH (E) (n=7 animales por grupo), de ratas hipertiroideas tratadas con vehículo ICV o ceramida ICV durante 6 días. \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Hipertiroideas Vehículo ICV vs Hipertiroideas Ceramidas ICV.*

Para evaluar el papel del ER estrés en los datos observados, inyectamos estereotáxicamente GRP78-DN en el VMH (Contreras et al., 2014b). Como en otros experimentos de adenovirus, la eficiencia de las inyecciones fue medida por la expresión de GFP en el VMH. Encontramos que tras la administración de GRP78-DN en el VMH de ratas hipertiroideas provocaba una ganancia de masa (**Figura 28A**), asociado con un incremento en el ER estrés en el VMH (**Figura 28E**), reducción en los niveles de UCP1 y en la ruta de AMPK en BAT (**Figura 28B-C**). No se detectaron cambios en la ruta de AMPK a nivel hepático (**Figura 28D**).





**Figura 28.** Efecto del ER estrés sobre las acciones centrales de la T3 en el metabolismo periférico. (A) Ganancia de masa corporal e ingesta (n=22-25 animales por grupo), (B-E) imágenes autorradiográficas representativas de western blot (panel superior e izquierdo) y niveles proteicos (panel inferior o derecho) de UCP1 en BAT (B) (n= 14 animales por grupo),

de la ruta de AMPK en BAT (C) ( $n=13-15$  animales por grupo), de la ruta de AMPK en hígado (D) ( $n=13-14$  animales por grupo) y de la ruta de ER estrés en el MBH (E) ( $n=7-14$  animales por grupo), de ratas hipertiroideas tratadas estereotáxicamente en el VMH con GFP o GRP78-DN durante 6 días.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ , Hipertiroideas GFP vs Hipertiroideas GRP78-DN.

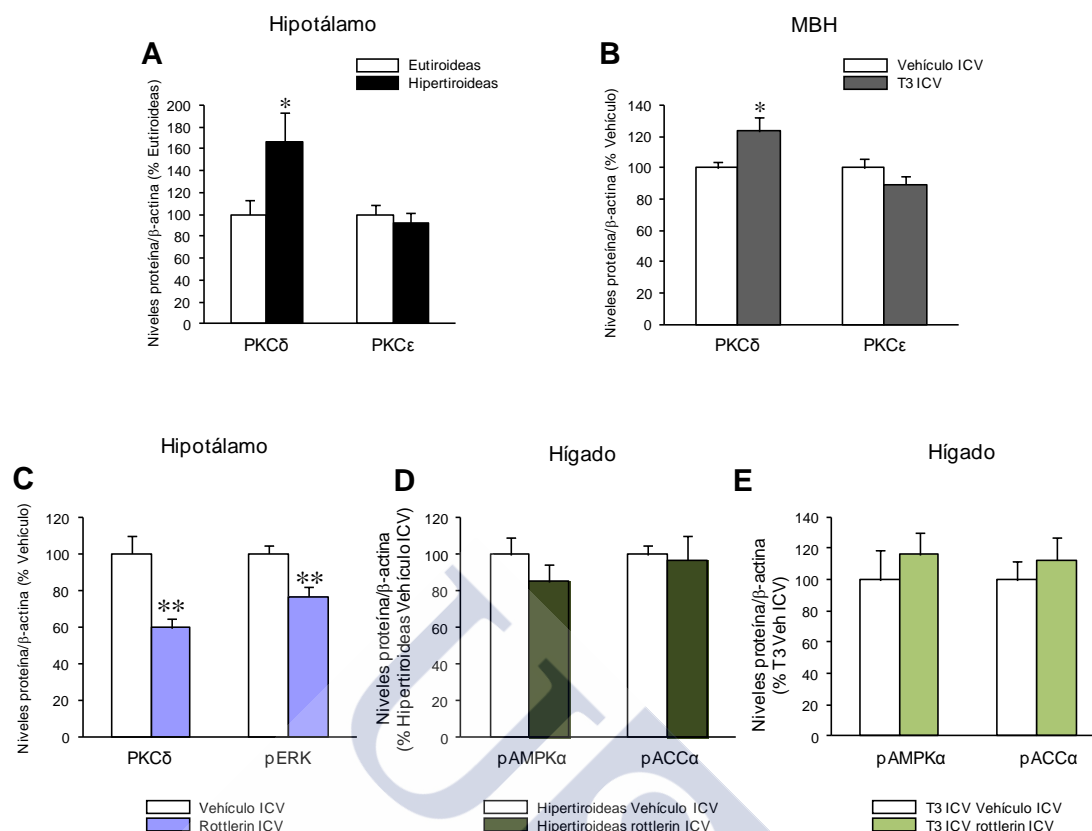
Nuestros datos muestran que los niveles de ceramidas y el ER estrés en el VMH, median las acciones de T3 y AMPK en BAT pero no en hígado.

### **La inhibición farmacológica de JNK revierte las acciones centrales de T3 en la lipogénesis de novo del hígado**

Investigamos los mecanismos moleculares que median los efectos de la T3 a nivel central en la función hepática. Recientes evidencias han mostrado que la proteína PKC juega un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa hepática a través del ANS (Benoit et al., 2009). Nosotros hipotetizamos la posible implicación de PKC en el efecto de la T3 sobre el metabolismo lipídico hepático. Nuestros datos mostraban, que PKC $\delta$ , pero no PKC $\epsilon$  estaban elevados en el hipotálamo y el MBH en ratas hipertiroideas y ratas tratadas con T3 ICV, respectivamente (**Figura 29A-B**).

Estos resultados podían ser indicativos de la implicación de PKC $\delta$  en la acción de T3. Para corroborar esta posibilidad, usamos un inhibidor de PKC, rottlerin, que al ser administrado centralmente provocaba un descenso en los niveles de proteína de PKC $\delta$  y sus proteínas diana pERK (**Figura 29C**).

Sin embargo, nuestros datos mostraban que no había efecto del rottlerin sobre los niveles hepáticos de pAMPK y pACC en ratas hipertiroideas y tratadas con T3 ICV (**Figura 29D-E**), indicando que la ruta de PKC no está involucrada en las acciones centrales de TH en el hígado.



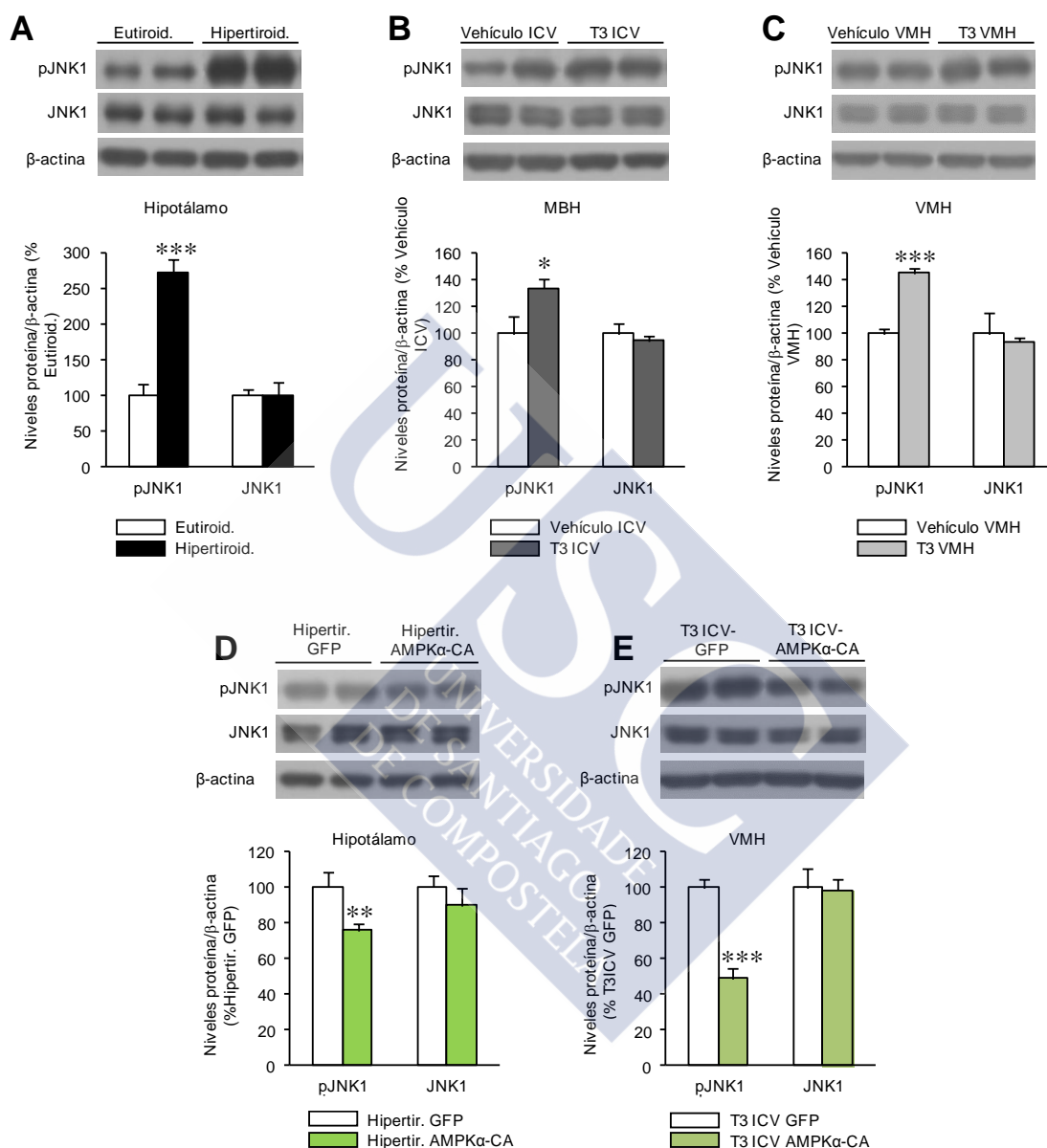
**Figura 29. Efecto de la inhibición de PKC en las acciones centrales de T3 en el metabolismo del hígado y del BAT.** (A y B) Niveles hipotalámicos y del MBH de PKC $\delta$  y PKC $\epsilon$  de ratas hipertiroidea ( $n=7$  animales por grupo) y ratas tratadas ICV con T3 ( $n=7$  animales por grupo), (C) niveles de PKC $\delta$  y de pERK en el hipotálamo de ratas tratadas ICV con el inhibidor de PKC ( $n=7$  animales por grupo); (D y E) niveles proteicos de PACC y PAMPK en hígado (D) y BAT (E) ( $n=7$  animales por grupo) de ratas hipertiroideas y ratas T3 ICV tratadas con Rottlerin ICV durante 6 días. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs Eutiroideas o Vehículo ICV.

JNK1 juega un papel crucial en la regulación hipotalámica de la ingesta y del metabolismo de la glucosa (Unger et al., 2010; Belgardt et al., 2010a; Belgardt et al., 2010b; Tsaousidou et al., 2014). Sin embargo, la implicación de JNK1 en la regulación del metabolismo hepático a través del ANS es actualmente desconocido.

Para verificar esta teoría, primero analizamos los niveles proteicos de JNK1 en el hipotálamo de ratas hipertiroideas, T3 ICV y T3 VMH. Nuestros datos mostraban que los niveles de proteína de pJNK1 estaban incrementados en el hipotálamo, el MBH y el VMH, respectivamente, de los modelos anteriormente mencionados (Figura 30A-C).

## Resultados

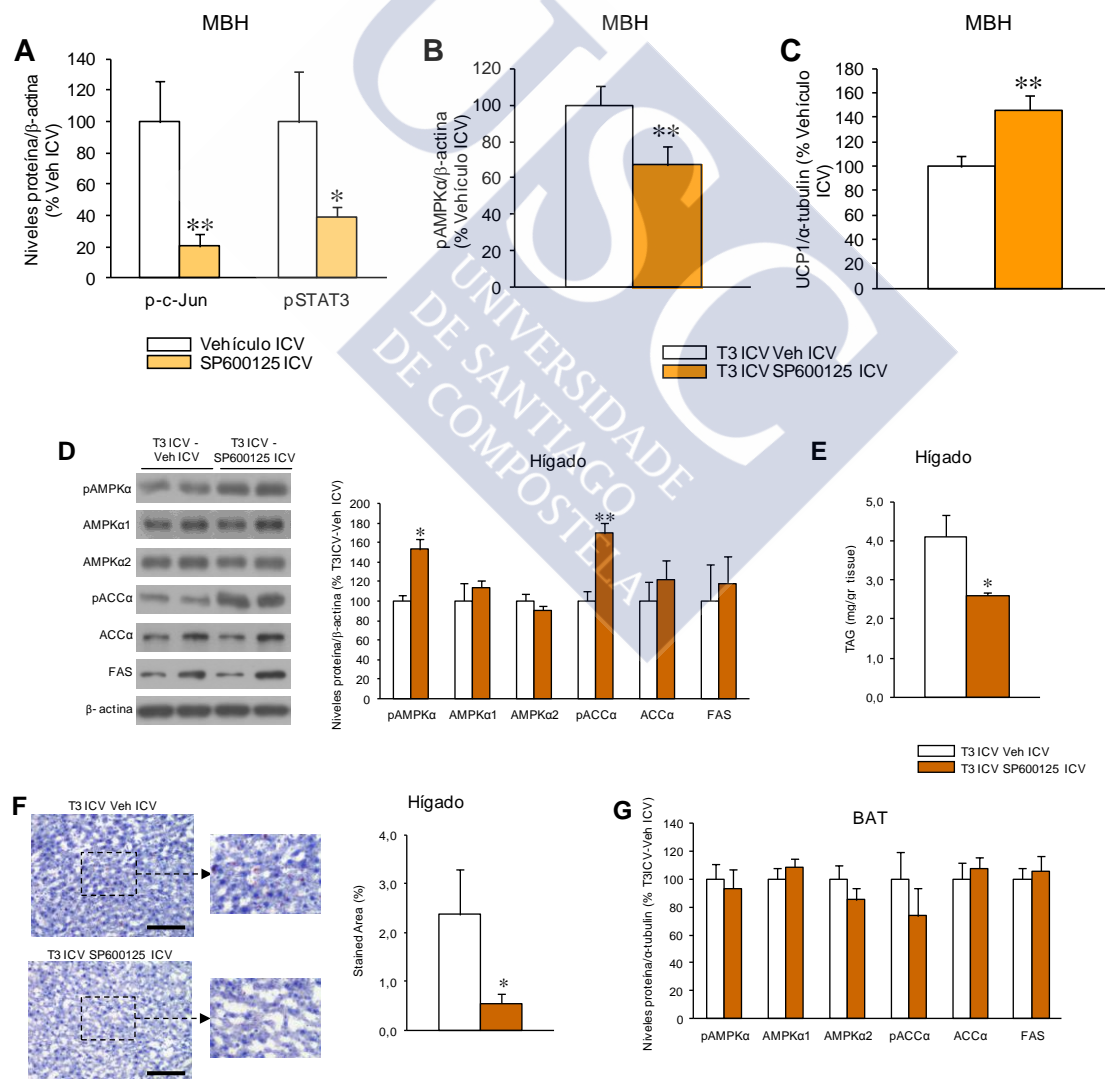
Además, el efecto del hipertiroidismo y la T3 en pJNK1 estaban revertidos cuando las ratas eran tratadas simultáneamente con AMPK $\alpha$ -CA dentro del VMH (**Figura 30D-E**), indicando que el efecto de las hormonas tiroideas era mediado por AMPK, que regula a su vez JNK1 (**Figura 30D-E**).



**Figura 30. Efecto de las hormonas tiroideas en JNK1.** (A-E) Imágenes autorradiografiadas representativas de western blot (paneles superiores) y niveles proteicos (paneles inferiores) de JNK1 y PJNK1 en el hipotálamo, MBH o VMH de ratas hipertiroideas (n=7 animales por grupo) (A), ratas tratadas ICV T3 (n=7 animales por grupo) (B), ratas tratadas con T3 en el VMH (n=7 animales por grupo) (C) y ratas hipertiroideas (n=7 animales por grupo) (D) y ratas tratadas con T3 ICV (n=11 animales por grupo) (E) tratadas estereotáxicamente con

AMPK $\alpha$ -CA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. *eutiroides*, *vehículo ICV*, *vehículo VMH*, *GFP VMH*.

Dado esto, nosotros barajamos la posibilidad de que JNK1 podía mediar las acciones centrales de T3 en la lipogénesis del hígado. Para ello, usamos un inhibidor de JNK llamado SP600125 administrado a nivel central. Al hacer esto, observamos un descenso en los niveles de p-c-Jun y pSTAT3, indicando la inhibición funcional de JNK1 (**Figura 31A**). El inhibidor de JNK fue capaz de revertir los efectos centrales de la T3 en la ruta hepática de AMPK, mediante el incremento de pAMPK y pACC (**Figura 31D**), seguido de una disminución en el contenido de TG (**Figura 31E**). Sin embargo, no se observaron cambios en pAMPK a nivel del MBH (**Figura 31B**), confirmando que JNK1 no estaba regulando AMPK a este nivel. Además, tampoco se observaron cambios en los niveles de UCP1 (**Figura 31C**) ni en la ruta de AMPK (**Figura 31G**) en el BAT, indicando que el efecto es específico sobre el hígado.

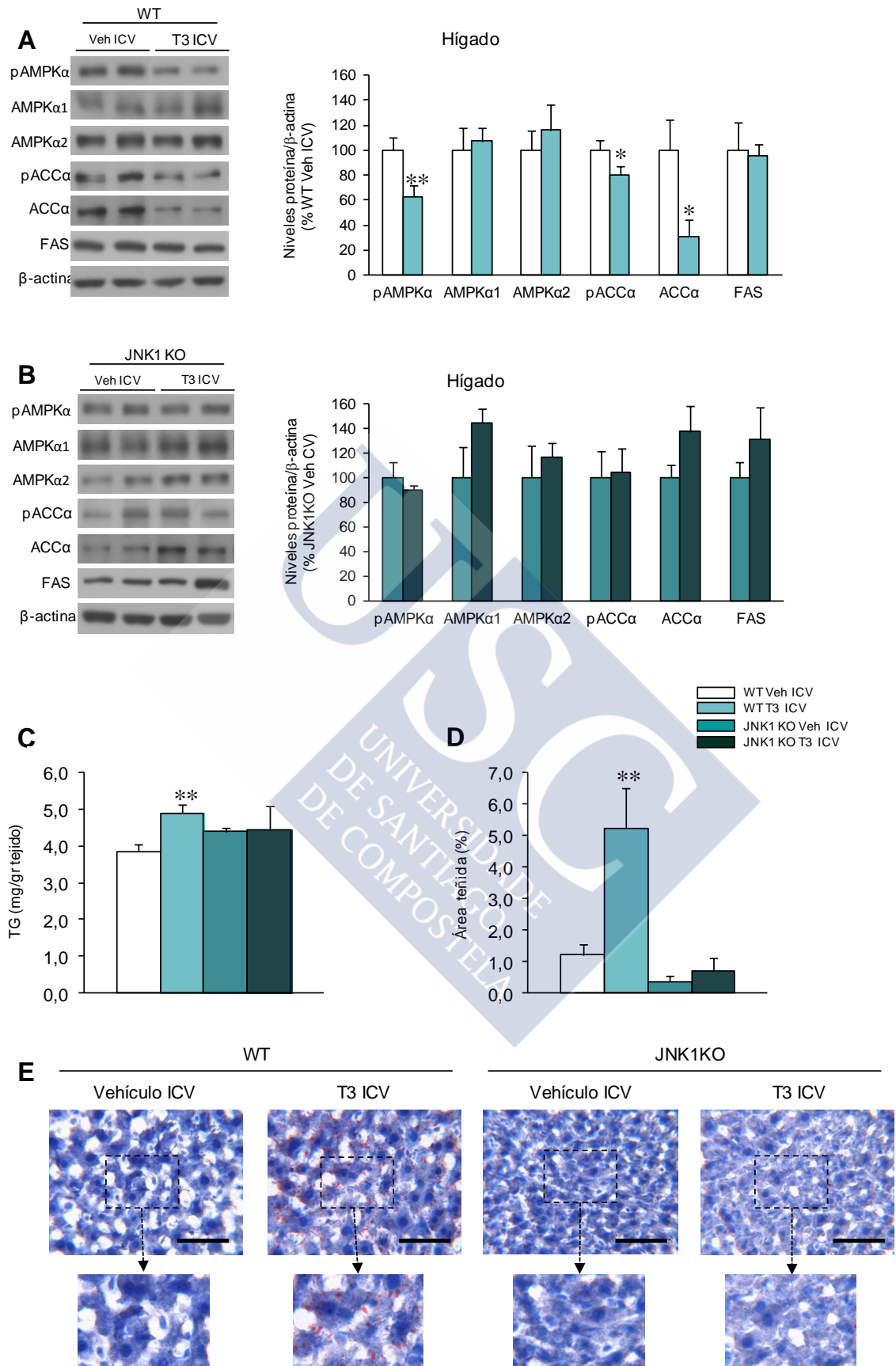


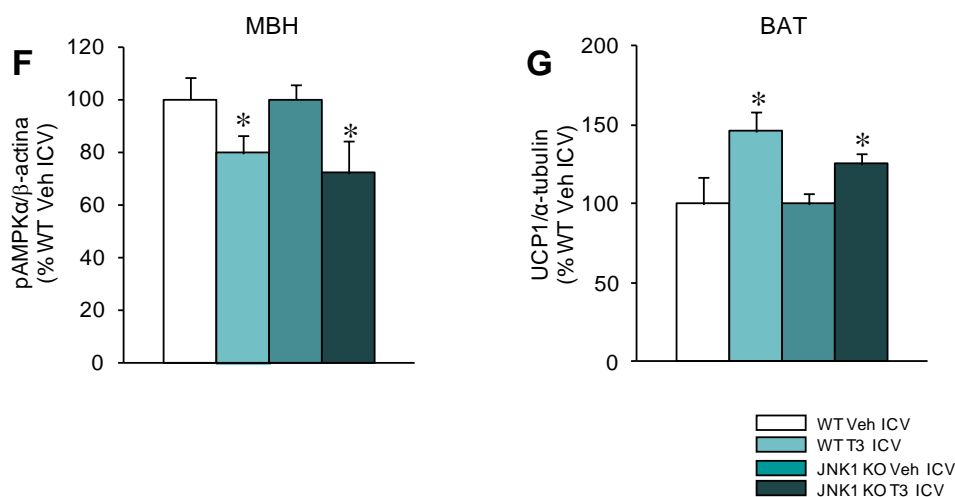
**Figura 31. Efecto de la inhibición hipotalámica de JNK en las acciones centrales de T3 sobre el metabolismo del hígado y de BAT.** (A) Niveles proteicos de p-c-Jun ( $n=7$  animales por grupo) y PSTAT3 ( $n=7$  animales por grupo) en el MBH de ratas tratadas ICV crónicamente con vehículo o el inhibidor de JNK (SP600125). (B y C) Niveles proteicos de pAMPK en el MBH (B) ( $n=7$  animales por grupo) y UCP1 en BAT (C) ( $n=7$  animales por grupo) en el MBH de ratas tratadas con T3 ICV y con el inhibidor de JNK (SP600125) durante 6 días (con sus respectivos controles). (D y G) Niveles proteicos de las enzimas implicadas en la ruta de AMPK en el hígado (D) ( $n=7$  animales por grupo) y el BAT (G) ( $n=7$  animales por grupo), (E) niveles de triglicéridos hepáticos ( $n=8$  animales por grupo), y (F) análisis de la tinción Oil Red O ( $n=7-8$  animales por grupo; 40X; barra de escala: 100 $\mu$ m) e imágenes representativas de secciones del hígado, de ratas tratadas ICV con T3 y con el inhibidor de JNK (SP600125). \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs. Vehículo ICV ó T3 ICV Vehículo ICV.

#### **JNK1 en el VMH media las acciones centrales de T3 en la lipogénesis de novo en el hígado.**

Para explorar la implicación de JNK1 en el efecto lipogénico de la T3 sobre el hígado, usamos ratones deficientes en *jnk1* y sus controles *wildtype*. Cuando les administramos centralmente T3, la ruta de AMPK en el hígado de los ratones WT disminuía pero no en los JNK1 KO (**Figura 32A-B**). En esta línea, los niveles de TG hepáticos y la tinción de cortes de hígado con Oil Red estaban elevados en los WT pero no en los JNK1 KO (**Figura 32D-E**). Sin embargo, AMPK estaba disminuido en el VMH de ambos ratones, WT y JNK1 KO, sugiriendo otra vez que AMPK está a su vez regulando JNK1 en el VMH (**Figura 32F**). Los niveles de UCP1 en el BAT, estaban incrementados tras la administración de T3 en ambos ratones (**Figura 32G**), sugiriendo que JNK1 media las acciones de la T3 a nivel hepático pero no en el BAT.







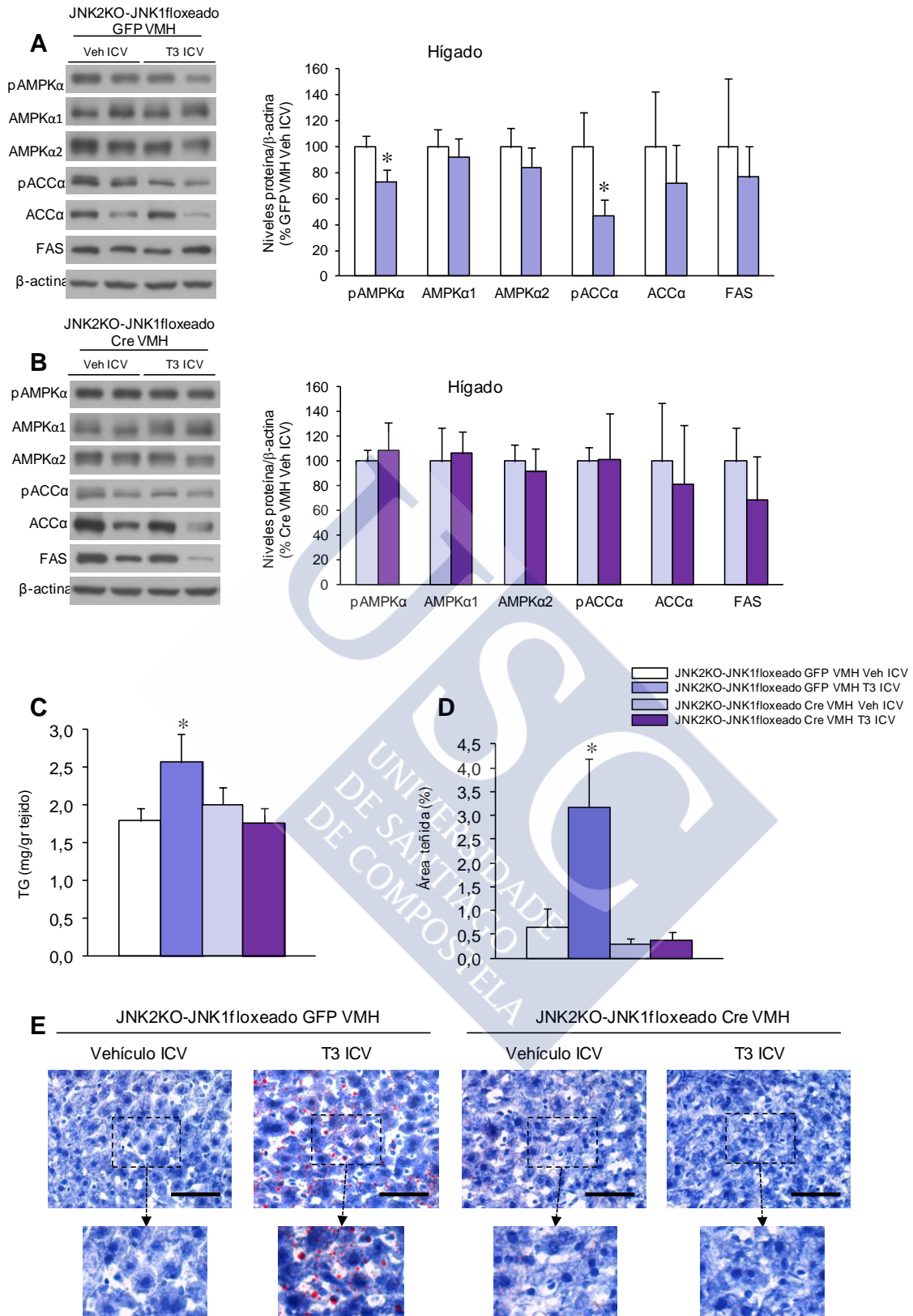
**Figura 32. Efecto de la eliminación total de JNK1 en las acciones centrales de T3 en el metabolismo hepático y del BAT.** (A y B) Imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) y niveles de proteínas (panel derecho) de diferentes proteínas implicadas en la ruta de AMPK en el hígado, (C) niveles de triglicéridos hepáticos, (D y E) cuantificación e imágenes representativas (40X; barra de escala: 50µm) de la tinción Oil Red O en ratones WT (n=4-6 animales por grupo) y ratones JNK1KO (n=4-6 animales por grupo). (F y G) Niveles proteicos de pAMPK en el MBH (F) y de UCP1 en el BAT (G) de ratones WT y ratones JNK1 KO (n=4-6 animales por grupo). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. WT Vehículo ICV o JNK1KO Vehículo ICV.

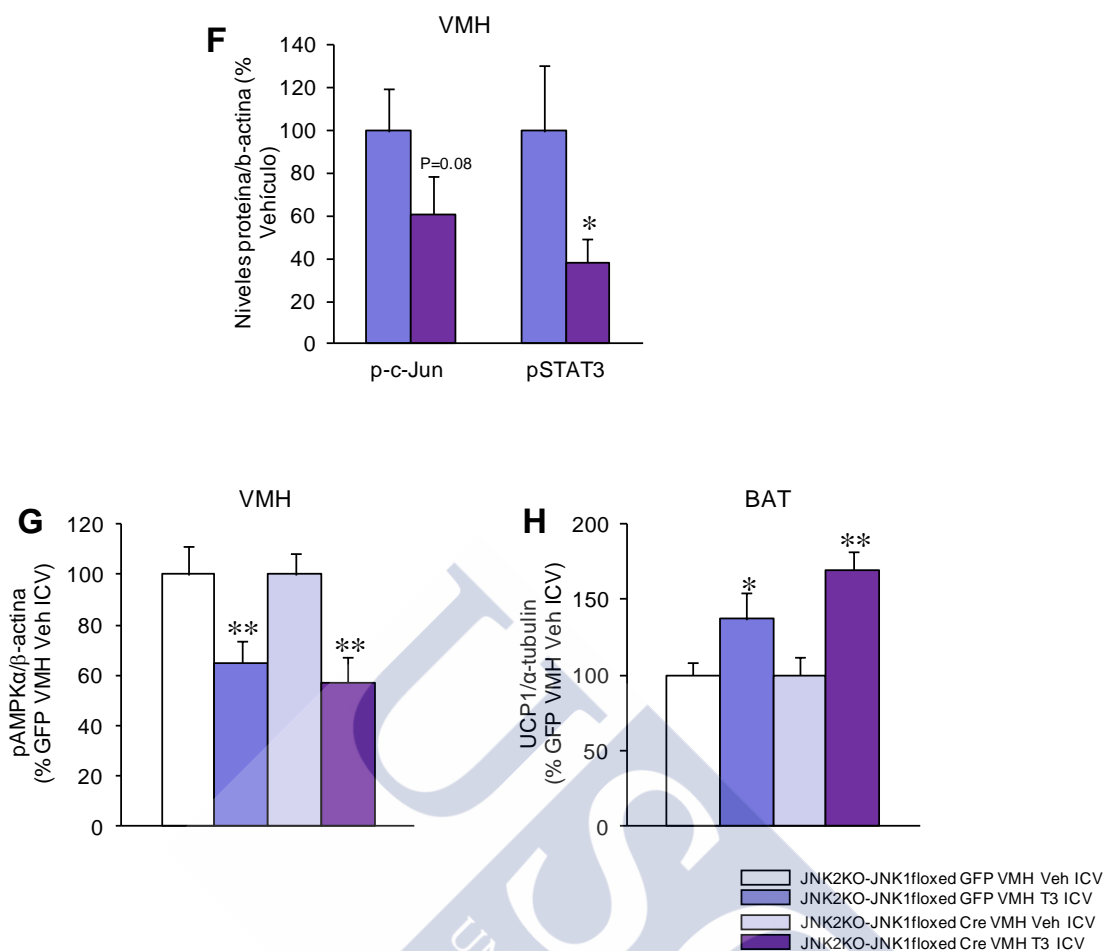
Para evaluar la contribución de JNK1 y JNK2 en la acción de la T3, decidimos repetir estos análisis pero en ratones deficientes en JNK2 a nivel global y que también eran floxeados para el gen *jnk1* en el VMH. Estos ratones fueron tratados con T3 a nivel central y previamente operados mediante estereotaxia en el VMH para la inserción de adenovirus expresando GFP o la enzima recombinasa Cre. La eficiencia de la infección fue demostrada mediante la disminución de los niveles p-c-Jun y pSTAT3 en el VMH (**Figura 33F**), indicando la inhibición funcional de JNK1.

Observamos en estos ratones que la T3 disminuye los niveles de pAMPK y pACC en el hígado de los ratones JNK2 KO-JNK1 floxeados que habían recibido GFP; sin embargo este efecto no fue observado en los ratones que habían recibido Cre en el VMH (**Figura 33A-B**).

En base a estas observaciones, T3 incrementó el contenido de TG (**Figura 33C**) y la tinción por Oil Red staining confirmaba este resultado en el hígado de los ratones tratados con GFP pero no con Cre (**Figura 33D-E**).

Al igual que en el ratón deficiente en JNK1, la T3 disminuye los niveles de pAMPK en el VMH (**Figura 33G**) en ambos modelos e incrementa los niveles de UCP1 en el BAT (**Figura 33H**).





**Figura 33. Efecto de la eliminación total de JNK2 y la eliminación de JNK1 en el VMH en las acciones centrales de T3 en el metabolismo hepático y del BAT. (A y B)** Imágenes autorradiográficas representativas (panel izquierdo) y niveles de proteínas (panel derecho) de diferentes proteínas implicadas en la ruta de AMPK en el hígado, (C) niveles de triglicéridos hepáticos, (D y E) cuantificación e imágenes representativas (40X; barra de escala: 50µm) de la tinción Oil Red O en ratones JNK2KO-JNK1 floxeados tratados con GFP o adenovirus Cre en el VMH y T3 ICV (n=5-7 animales por grupo para todos los análisis excepto para el Oil Red O, que se usaron 3-4 animales por grupo, 4 secciones por animal). (F) Niveles proteicos de p-c-Jun y pSTAT3 en el VMH, (G y H) niveles proteicos de pAMPK en el MBH (G) y de UCP1 en el BAT (H) de ratones JNK2KO-JNK1 floxeados tratados con GFP o adenovirus Cre en el VMH y T3 ICV (n=5-7 animales por grupo). \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs. JNK2KO-JNK1floxeado GFP Vehículo ICV o JNK2KO-JNK1floxeado Cre Vehículo ICV.

Esto indica que JNK1 en el VMH media las acciones de la T3 en la lipogénesis hepática pero no en las acciones del BAT.











En este estudio hemos podido comprobar que las hormonas tiroideas a nivel central ejercen efectos sobre el metabolismo lipídico periférico, descubriendo también las rutas subyacentes por las cuales actúan.

Las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo, pero también para la correcta regulación del metabolismo; así, las hormonas tiroideas regulan un gran número de procesos metabólicos y es extensamente comprobado que el estado de los niveles de las hormonas tiroideas correlaciona con la masa corporal y el gasto energético (Knudsen et al., 2005; Iwen et al., 2013; Fox et al., 2008; Brent, 2012). Una de las principales características de las personas con una disfunción en la tiroides es la existencia de hiperfagia, la pérdida de masa y un estado hipermetabólico cuando existe hipertiroidismo (exceso de hormonas tiroideas) (Mullur et al., 2014). Esta condición, es observada también en nuestro modelo de hipertiroidismo en roedores, los cuales presenta un claro descenso en la masa corporal y una marcada hiperfagia, junto con unos niveles circulantes elevados de T4 y T3, corroborando su estatus hipertiroideo. La visión clásica de las hormonas tiroideas asume que la mayoría de los efectos de dichas hormonas son a través de una acción periférica (Silva, 2006). Sin embargo, datos recientes indican que las acciones de las hormonas tiroideas son mediadas también a través de una acción central (Fliers et al., 2010a; Warner and Mittag, 2012; Lopez et al., 2013). En consonancia con esto, tras la administración central de T3 pudimos observar el mismo descenso de masa corporal en las ratas tratadas pero sin cambios en los niveles circulantes de T4 y T3 (lo que apoya que este efecto metabólico no es debido a un incremento de dichas hormonas a nivel periférico).

Las hormonas tiroideas modulan el metabolismo lipídico en tejidos periféricos (Volpe and Kishimoto, 1972; Gnoni et al., 1983; Blennemann et al., 1992; Hagenfeldt et al., 1981; Beylot et al., 1991; Riis et al., 2002). Específicamente, las hormonas tiroideas regulan la síntesis de lípidos en el hígado, el músculo, el WAT, el BAT y el hipotálamo por modulación de la expresión y activación de enzimas lipogénicas clave como ACC, FAS y AMPK (Lopez et al., 2010b; Varela et al., 2012; Mullur et al., 2014). Nosotros hipotetizamos que las alteraciones lipogénicas podrían estar mediadas al menos en parte por la acción de la T3 en el hipotálamo. En este estudio demostramos que tanto el hipertiroidismo como la T3 a nivel central, incrementan la lipogénesis *de novo* en el hígado (descienden los niveles de pACC y pAMPK, incrementan los de FAS), así como la formación de triacilglicéridos. Sin embargo en el BAT el efecto lipogénico es el contrario aunque el programa termogénico está incrementado. La especificidad de este efecto queda demostrada por el hecho de que en el músculo o el WAT la T3 a nivel central no tiene efectos en el metabolismo lipídico.

Aunque clásicamente el VMH es considerado como un regulador del control de la ingesta (*'the satiey center'*), recientes evidencias revelan un complejo papel fisiológico para este

núcleo. Otros estudios apoyan diferentes roles metabólicos para el VMH, demostrando una compleja función de este área en el control de la ingesta (Lopez et al., 2008; Dhillon et al., 2006), del gasto energético (Lopez et al., 2010b; Whittle et al., 2012; Martinez de Morentin et al., 2012b; Contreras et al., 2014b) y de la homeostasis de la glucosa (Tong et al., 2007; McCrimmon et al., 2008). En consonancia con estos conocimientos y en base a nuestros datos, observamos que la T3 administrada en el VMH regula la lipogénesis de novo en el hígado y en el BAT, produciendo también una pérdida de masa independiente de la ingesta así como un incremento de la termogénesis en el BAT. Vemos que tras la administración de T3 en el VMH, en el hígado se activa la lipogénesis de novo mientras que en el BAT está inhibida (como habíamos observado hasta ahora en el modelo hipertiroideo y el T3 central). Sin embargo la T3 en el ARC, un área cercana y también implicada en el balance energético, no ejerce efecto a nivel del metabolismo lipídico ni en BAT ni en hígado, dando especificidad al VMH.

Hace unos pocos años se estableció un link entre los efectos centrales de las hormonas tiroideas, AMPK y BAT. Específicamente se demostró que la activación del programa termogénico en BAT a través del SNS dependía de la activación mediada por T3 en la lipogénesis *de novo* en el hipotálamo, mediante la inhibición de AMPK (Lopez et al., 2010b). Se sabe también que AMPK en el VMH está involucrado en la integración de señales periféricas, como la ghrelin y la leptina, con las redes de señalización hipotalámicas (Kola et al., 2008; Lage et al., 2010) y en la detección de hipoglicemia aguda y en mecanismos de respuesta a la glucosa (McCrimmon et al., 2008). La especificidad de AMPK quedó claramente demostrada con la administración de adenovirus para esta proteína en el VMH; con la administración de virus AMPK-DN observamos una pérdida de masa independiente de la ingesta así como un incremento en los niveles de UCP1; además, la inhibición genética de AMPK provocaba también la inhibición de la ruta de señalización de AMPK en el hígado y el incremento en el BAT. Sin embargo, tras la sobre-expresión de AMPK en el VMH en ratas hipertiroideas observamos una ganancia de peso, y los efectos en la lipogénesis *de novo* a nivel hepático y del BAT eran revertidos; lo mismo ocurre tras la sobre-expresión de esta proteína en ratas centralmente tratadas con T3. Todo esto apoya que las hormonas tiroideas tienen un efecto central a través de AMPK y así regulan a nivel periférico el metabolismo lipídico tanto en hígado como en BAT.

La importancia del CNS en la mediación de los efectos de las hormonas tiroideas en el metabolismo lipídico periférico no está clara. Sin embargo, décadas antes del descubrimiento y el aislamiento de la T4, el aumento de la actividad del SNS ya se creía que desempeñaba un importante papel fisiopatológico en enfermedades como la enfermedad de Graves. Esto se vio apoyado en el siglo 19 por el tratamiento de la tirotoxicosis severa a través de la resección de la cadena simpática cervical (Leak, D. (1970) *The Thyroid and the Autonomic Nervous System*,

William Heinemann Medical Books). Actualmente, los bloqueadores  $\beta$ -adrenérgicos son utilizados rutinariamente para el manejo inicial de la tiroxicosis severa, caracterizada por nerviosismo, sudoración excesiva, intolerancia al calor y pérdida de masa (Fliers et al., 2010a). Por otro lado, las hormonas tiroideas juegan un papel clave en la termogénesis obligatoria y adaptativa (Lowell and Flier, 1997; Lowell and Spiegelman, 2000); el principal sitio de la termogénesis adaptativa en roedores es el BAT donde el SNS y las hormonas tiroideas son esenciales para el mantenimiento de la temperatura corporal (Ribeiro et al., 2000; Ribeiro et al., 2001). Además la expresión de UCP1 es requerida para la termogénesis en el BAT, y esta proteína es sinérgicamente regulada por NE y T3 (Mullur et al., 2014). La relación entre la actividad del SNS y el estado tiroideo es complejo, y señala diferentes efectos dependiendo del órgano (corazón, músculo) y tejido (tejido adiposo) estudiado.

Nuestro grupo ya había demostrado que la expresión de los marcadores termogénicos tras la administración central de T3 estaba mediada por los  $\beta$ -3 AR (Lopez et al., 2010b). Aquí a mayores, evaluamos lo que ocurría a nivel del metabolismo lipídico observando que tras la inhibición farmacológica del SNS, se revierten los efectos de la T3 en el BAT, pero sin embargo no ocurría nada en el hígado, es decir, la T3 a nivel central actúa sobre la lipogénesis *de novo* en el BAT a través del SNS pero no en el hígado, donde seguíamos observando el mismo efecto.

Como hemos mencionado antes, las hormonas pueden regular el metabolismo directamente por acciones en los tejidos diana a través de receptores, pero también pueden ejercer sus acciones indirectamente a través de los núcleos hipotalámicos utilizando el sistema nervioso autónomo para controlar procesos metabólicos (Kalsbeek et al., 2004; Kreier et al., 2006; Fliers et al., 2010b). Desde el DMV, proyecciones presinápticas del parasimpático viajan a través del nervio vago, haciendo posteriormente sinapsis con neuronas postsinápticas en ganglios cerca de órganos viscerales, como, por ejemplo, el hígado (Barthel and Schmoll, 2003). En relación con esto, se ha observado en varios estudios que el hipotálamo puede modular la producción endógena de glucosa mediante el uso recíproco de *outputs* del sistema nervioso simpático y parasimpático hacia el hígado (van den Hoek et al., 2008; Sandoval et al., 2008; Poci et al., 2005). En nuestro estudio observamos que tras la administración central de T3 se producía un incremento en c-FOS (marcador de la actividad neuronal) en el DMV. En base a esto, tras la denervación del nervio vago hacia el hígado, el análisis de los resultados mostró que los efectos de la T3 sobre la lipogénesis *de novo* en el hígado se veían eliminados aunque los efectos en el BAT y la pérdida de masa no sufrían cambios. Estos resultados seguían la misma línea que estudios anteriores, apoyando que las acciones centrales de la T3 sobre la lipogénesis *de novo* en el hígado implicaban al PSNS, y aunque era sabido que las hormonas tiroideas modulaban el metabolismo lipídico en tejidos periféricos (Klieverik et al., 2009a;

Duntas and Brenta, 2012) no había evidencias claras que mostraran esta regulación a través del PSNS.

Las ceramidas son importantes reguladores del balance energético y el metabolismo (Turpin et al., 2014; Holland et al., 2011; Raichur et al., 2014; Xia et al., 2015). En tejidos periféricos las especies reactivas de lípidos como las ceramidas son un mecanismo patogénico de resistencia a insulina; este proceso conocido como lipotoxicidad ocurre a través de la inflamación y el ER estrés (Unger, 2002; Fu et al., 2012; Summers, 2006). El ER está involucrado en el almacenamiento de calcio y en la biosíntesis de lípidos. Existen una serie de factores que activan estas proteínas UPR incluyendo el exceso de nutrientes, la privación o el estrés oxidativo (Cunard, 2015). Varios estudios han demostrado que la señalización de las UPR y el ER estrés están asociados con cambios fisiopatológicos y metabólicos, incluyendo la obesidad, la diabetes tipo 2, la aterosclerosis, la patología cardíaca y enfermedades de hígado (Park and Ozcan, 2013; Lee and Ozcan, 2014). Ozcan y colaboradores identificaron el ER estrés como un vínculo molecular entre la obesidad, el deterioro de la acción de la insulina y el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Ozcan et al., 2004). Nuestros resultados mostraron que el hipertiroidismo reduce los niveles hipotalámicos de ceramidas y ER estrés; lo mismo ocurre con la T3 a nivel central o bien con la T3 administrada estereotaxicamente en el VMH. Esto se observa por los bajos niveles de AFT6, CHOP y pPERK. Sin embargo los niveles de GRP78, la chaperona ubicada más upstream en la UPR, están incrementados. En otras áreas como el cortex ocurre lo contrario. Al analizar los niveles de ceramidas y los marcadores de ER estrés en los animales en los que AMPK fue reducido genéticamente, observamos el mismo patrón, descenso de los niveles de ceramidas y de ER estrés; ocurre lo contrario cuando se sobre-expresa AMPK. En base a esto nosotros deducimos que el efecto central de la T3 provoca un descenso en los niveles de ceramidas y ER estrés en el hipotálamo y que este efecto está mediado por AMPK en el VMH.

Recientes datos de nuestro grupo, han demostrado que la lipotoxicidad inducida por ceramidas a nivel central induce ER estrés conduciendo a una ganancia de masa y un descenso en el tono simpático y en el programa termogénico (Contreras et al., 2014b). En base a estas evidencias, hipotetizamos un posible vínculo entre T3 y ER estrés. Al evaluar los resultados tras la administración central de ceramidas en ratas tratadas con T3 comprobamos que los efectos de la T3 sobre la pérdida de masa y la termogénesis eran revertidos (descenso de UCP1) y la ruta metabólica de AMPK también estaba disminuida (contrario a los efectos de T3); sin embargo a nivel hepático no observamos estos efectos. Por otra parte, cuando inducíamos ER estrés en el VMH observábamos el mismo efecto que con las ceramidas, es decir, el programa termogénico y la ruta de señalización de AMPK en BAT disminuye, sin embargo a nivel hepático no ocurría

ningún cambio. En base a estos resultados, podemos decir que los niveles de ceramidas y el ER estrés en el VMH están mediando los efectos centrales de la T3 y de AMPK en BAT.

El cerebro parece ser un posible sitio donde JNK1 ejerce su regulación sobre la obesidad, debido a la implicación del hipotálamo en esta patología. La función de esta proteína en el sistema nervioso parece ser compleja pero sin embargo hay indicios para pensar que el eje hipotálamo-hipofisis- tiroideas es una de las más importantes dianas de JNK1 para ejercer sus funciones metabólicas (Sabio et al., 2010a; Belgardt et al., 2010b). Estudios a un nivel global del organismo han observado que los ratones deficientes en esta kinasa controla la acumulación y la captación de lípidos en el hígado (Imbernon et al., 2013). Después de analizar los niveles de JNK1 a nivel central en nuestros modelos, observamos que tanto las hormonas tiroideas a nivel periférico como a nivel central y núcleo-específico poseían los niveles de pJNK1 elevados; estos niveles elevados se revertían cuando sobreexpresábamos AMPK en ratas hipertiroideas o tratadas centralmente con T3, lo que nos llevó a postular que AMPK está *upstream* de JNK. Debido a las investigaciones previas de otros grupos con JNK1 (Bennett et al., 2003; Nakatani et al., 2004; Sabio et al., 2009; Sabio and Davis, 2010; Sabio et al., 2010a; Belgardt et al., 2010a; Imbernon et al., 2013) decidimos seguir investigando esta vía y ver que implicaciones podía tener en las acciones de las hormonas tiroideas sobre el metabolismo lipídico hepático; de este modo, al administrar un inhibidor de esta proteína a nivel central junto con la T3 pudimos observar que los efectos de la T3 en presencia del inhibidor se veían eliminados a nivel hepático, pero en el BAT no tenía efecto; a nivel de los triglicéridos hepáticos también dejaba de tener efecto la T3 en presencia del inhibidor de JNK. Esto nos indicaba que el efecto de JNK era específico del hígado. Sin embargo para explorar mejor el efecto lipogénico de JNK1 usamos ratones deficientes en JNK1 a nivel global de todo el cuerpo y al suministrarles T3, observamos que las acciones de la T3 sobre el hígado se veían revertidas, aunque en el BAT seguía ocurriendo lo mismo (incremento de UCPI e incremento de pACC y pAMPK). Los niveles de los triglicéridos también estaban disminuidos cuando JNK1 era eliminado. En conjunto estos resultados sugerían un posible papel de JNK1 hipotalámico como mediador de las acciones centrales de T3 sobre el metabolismo lipídico hepático. No obstante, en este punto tampoco podíamos excluir la implicación de JNK2 en este proceso (Gupta et al., 1995; Liedtke and Trautwein, 2006) y nuestra idea era poder dar más especificidad a JNK1 sobretudo a nivel central. Para ello tras abolir JNK1 en el VMH de ratones carentes de JNK2 a nivel global y administrarles T3 ICV observamos que efectivamente, sólo JNK1 tenía implicaciones a nivel hepático tras la administración de T3 a nivel central; en los ratones JNK2 *knock out* sin eliminar JNK1 en el VMH la T3 seguía ejerciendo el mismo efecto a nivel hepático, con incremento de la lipogénesis *de novo* e incremento de triacilglicéridos; sin embargo en los ratones donde JNK1 fue eliminado en el VMH, estos efectos a nivel hepático no eran observados. A nivel del BAT,

la T3 seguía afectando a este órgano de igual forma, es decir, los niveles de UCP1 estaban incrementados. A nivel hipotalámico, en ninguno de los ratones observamos cambios en relación a la acción de T3 sobre AMPK (disminuía en ambos casos). Estos datos nos han indicado que JNK1 en el VMH media las acciones centrales en la lipogénesis hepática pero no en el BAT, pero está situado *downstream* de AMPK. Es importante destacar que con los resultados obtenidos, no se puede excluir una implicación de JNK3, aunque de las tres isoformas parece ser la que menos implicaciones tiene en el metabolismo hasta este momento conocidas (Coffey, 2014).

El resultado neto de la administración central de T3 a nivel hepático es un incremento de la lipogénesis. En este sentido, los datos mostrados por el oleato marcado demuestran que la síntesis *de novo* de ácidos grasos y la captación dentro del hígado está incrementada. Nuestros estudios anteriores demostraron que la T3 a nivel central aumenta la actividad termogénica en este tejido (Lopez et al., 2010b), esto concuerda con los valores incrementados de C<sup>14</sup> en el BAT. Es posible que este incremento del C<sup>14</sup> encontrado en el BAT surja por un lado de la captación directa de ácidos grasos circulantes (Ouellet et al., 2012) y por otro, de los triglicéridos sintetizados por el hígado (Bartelt et al., 2011; Gibbons et al., 2000). Las lipoproteínas ricas en triglicéridos son conocidas por su contribución al contenido de lípidos en el BAT durante la termogénesis y su captación es regulada por lipasas específicas (Bartelt et al., 2011; Bruinstroop et al., 2014) cuya actividad está incrementada en el BAT después de la administración de T3 a nivel central (Lopez et al., 2010b). Sin embargo en el BAT, nuestros resultados no demuestran un incremento en los niveles de TG marcados con C<sup>14</sup>, esto puede deberse al incremento que posee este tejido en la beta-oxidación tras la administración de T3. Aunque la termogénesis está incrementada, no observamos una activación del programa lipogénico en el BAT; este hecho sumado a que los niveles del metabolito C<sup>14</sup> está incrementado en suero, pueden apuntar a un posible suministro de energía por parte del hígado hacia el BAT.

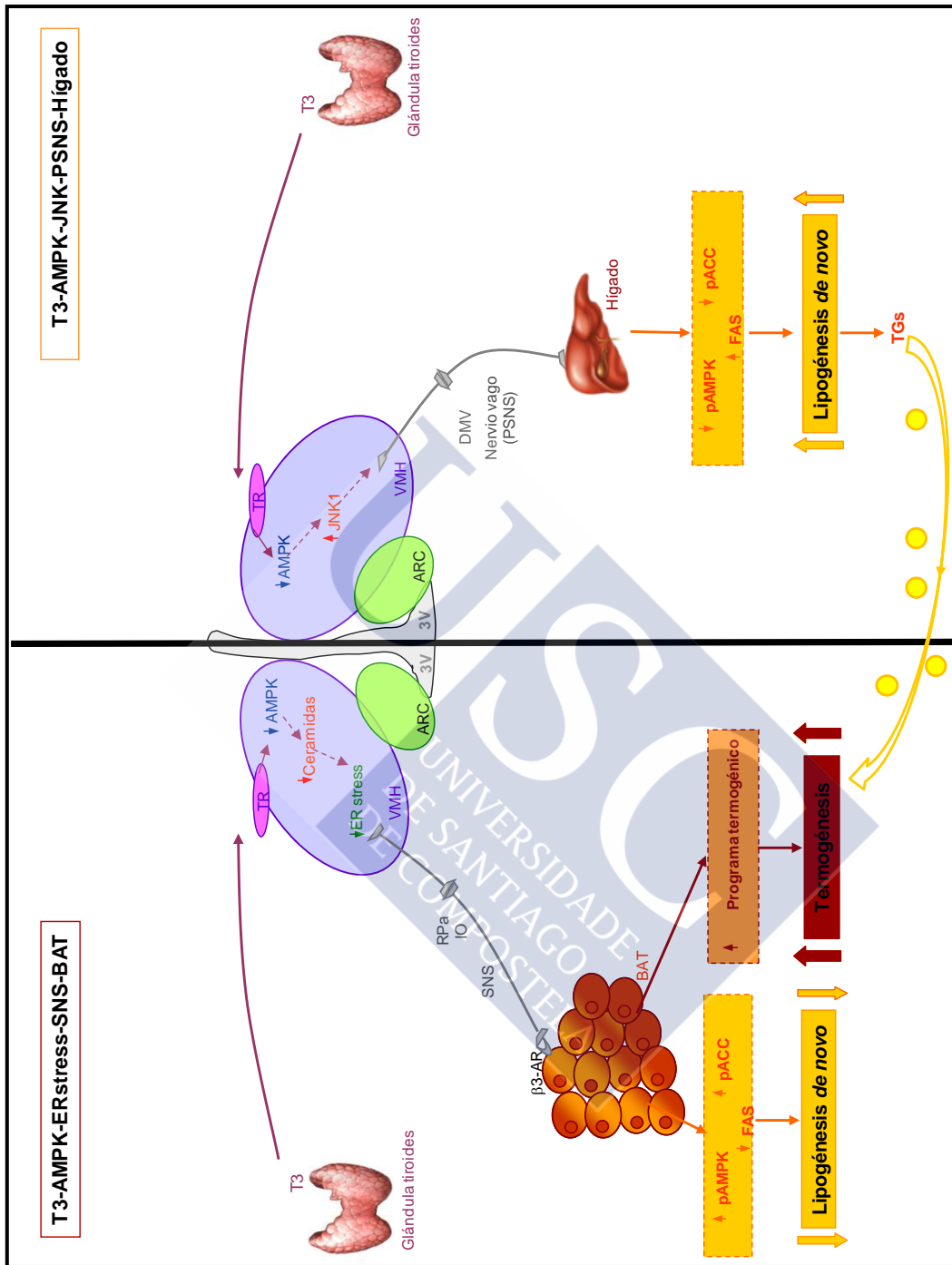
La idea global de nuestro estudio, es que el hipertiroidismo y la T3 a nivel central inducen un marcado incremento en la lipogénesis *de novo* específicamente en el hipotálamo lo que lleva a un incremento en la actividad del BAT a través del SNS conduciendo a una pérdida de peso; por otro lado también provoca un incremento en la lipogénesis *de novo* en el hígado, incrementando los niveles de TG en dicho tejido a través del sistema nervioso parasimpático. Las acciones centrales de T3 y AMPK hacia el BAT van a estar mediadas por bajos niveles de ceramidas que lleva a bajo ER estrés, mientras que hacia el hígado van a estar mediadas por JNK1. Todo esto estará mediado por AMPK en un núcleo específico que es el VMH. Nuestros datos parecen indicar que este incremento en la producción de lípidos después de la administración de T3 son redireccionados hacia el BAT, donde sirven de combustible para la maquinaria termogénica debido a que esta está incrementada también por las acciones de la T3.

Todo esto describe un nuevo papel sobre la acción de las hormonas tiroideas en el VMH describiendo un nuevo circuito desconocido que modula el metabolismo lipídico a nivel periférico a través de dos vías distintas.

En resumen, podemos concluir que a través de este doble mecanismo hipotálamo, controlado inicialmente por AMPK, la T3 maximiza las capacidades metabólicas de cada tejido: la lipogénesis en el hígado y la termogénesis en el BAT, que a su vez usa como combustible los lípidos hepáticos.



**Resumen gráfico**









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

- T3 a nivel central regula la lipogénesis *de novo* y la termogénesis en el BAT produciendo una pérdida de masa corporal independiente de la ingesta.
- T3 a nivel central regula la lipogénesis *de novo* a nivel hepático a través del PSNS y la lipogénesis en el BAT a través del SNS.
- T3 actúa de manera específica en el VMH y sus acciones están mediadas por la actividad de AMPK a este nivel.
- El efecto central de la T3 sobre estos tejidos periféricos es mediado en el caso del BAT por el ER estrés hipotalámico inducido por ceramidas, y en el caso del hígado, por el incremento a nivel central de JNK.





## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---





**Ad:** adenovirus  
**AICAR:** 5-Aminoimidazola-4-carboxamida-1-β-D-ribofuranosido  
**AR-α:** receptor adrenérgico α  
**AR-β:** receptor adrenérgico β  
**ACC:** acetil-CoA carboxilasa  
**ACER1:** Alkaline ceramidase 1  
**ACTH:** hormona adrenocorticotropina  
**AgRP:** proteína relacionada con agouti  
**AMP:** adenosin monofosfato  
**AMPC:** adenosin monofosfato cíclico  
**AMPK:** kinasa activada por AMP  
**AMPK-CA:** adenovirus AMPK activados constitutivamente  
**AMPK-DN:** adenovirus AMPK dominantes negativos  
**AMT:** aminotriazol  
**AP:** área postrema  
**ARC:** núcleo arcuato hipotalámico  
**ATF6:** *Activating transcription factor 6*  
**ATGL:** *triglyceride lipase*  
**ATP:** adenosín trifosfato  
**BAT:** tejido adiposo marrón  
**BBB:** barrera hematoencefálica  
**BDNF:** factor neurotrófico derivado del cerebro  
**CART:** transcrito regulado por anfetamina y cocaína  
**CCK:** colecistoquinina  
**CDIPT:** *phosphatidylinositol synthase*  
**CerS/LASS1:** Ceramide synthase 1 (CerS1), LAG1 longevity assurance homolog 1  
**CNS:** central nervous system, sistema nervioso central (SNC)  
**CNTF:** factor neurotrófico ciliar  
**CPT-1:** carnitina-palmitoil transferasa-1  
**CRE:** elemento de respuesta a AMPc  
**CRH:** hormona liberadora de corticotropina  
**DAG:** diacilglicerol  
**DGAT1:** *diacylglycerol O-Acyl transferase 1*  
**DMH:** núcleo dorsomedial del hipotálamo  
**DMSO:** dimetil sulfóxido  
**DMV:** núcleo dorsal motor del vago  
**D1:** deyodinasas 1  
**D2:** deyodinasas 2  
**D3:** deyodinasas 3  
**FAS:** ácido graso sintasa  
**FABP3:** proteína de unión a ácidos grasos 3  
**FFAs:** ácidos grasos libres  
**FoxO1:** *Forkhead box O1*  
**GLP-1:** péptido similar al glucagón-1  
**GLP1R:** receptor de GLP-1  
**GRP78/ BIP:** *chaperone immunoglobulin heavy chain binding protein*  
**HSL:** lipasa sensible a hormonas  
**ICV:** intracerebroventricular  
**IO:** núcleo inferior de la oliva  
**IP:** intraperitoneal  
**IRE:** *Inositol-requiring protein-1*  
**JNKs:** quinasas c-Jun N-terminal

**KO:** knockout  
**LCFAs:** ácidos grasos de cadena larga  
**LHA:** hipotálamo lateral  
**LPL:** lipoprotein lipasa  
**MAGL:** *monoacylglycerol lipase*  
**Malonil-CoA:** malonil-coenzima A  
**MC-R:** receptor de las melanocortinas  
**MCD:** malonil-CoA decarboxilasa  
**MCH:** hormona concentradora de melanina  
**mTOR:** *mammalian Target of Rapamicyn*  
**NE:** norepinefrina  
**NEFA:** *non-esterified fatty acids*  
**NPY:** neuropéptido y  
**NRF-1:** factor de respiración nuclear 1  
**NTS:** núcleo del tracto solitario  
**OX:** orexinas (hipocretinas)  
**PCYT1A:** *phosphatidyl transferase 1, choline, alpha*  
**PERK:** *PKR-like ER kinase*  
**PGC1:** coactivador tipo 1 del receptor activado por el proliferador de peroxisomas  
**PKA:** proteína-kinasa dependiente de AMPc  
**PLA2G4A:** Cytosolic phospholipase A2, (*phospholipase A2*)  
**PNPLA2:** Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 2  
**POMC:** propiomelanocortina  
**PP:** polipéptido pancreático  
**PPAR:** receptor activado por el proliferador de peroxisomas  
**PSNS:** sistema nervioso parasimpático  
**pSTAT3:** *phospho signal transducer and activator of transcription 3*  
**PTDSS1:** *phosphatidilserine synthase 1*  
**PVH:** núcleo paraventricular hipotalámico  
**RPa:** *raphe pallidus*  
**SCD-1:** *Stearoyl-Coenzyme A desaturase-1*  
**SMase:** esfingomielina fosfodiesterasa  
**SMPD2:** *sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral*  
**SGMS1:** *sphingomyelin synthase*  
**SNS:** sistema nervioso simpático  
**SPT:** serina C-palmitoiltransferasa  
**SPTLC1:** *serine palmitoyltransferase, long chain sbud.1*  
**SREBP:** proteína de unión a elementos regulados por esteroles  
**TG:** triglicéridos  
**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  $\alpha$   
**TR:** receptor de hormonas tiroideas  
**TR-DN:** receptor de hormonas tiroideas dominante negativo  
**TRH:** hormona secretora de tirotropina  
**TSH:** hormona estimuladora del tiroides  
**T2:** 3,5-L-diyodotironina  
**T3:** 3,5,3'-triyodo-L-tironina  
**T4:** L-Thyroxine  
**UCP:** proteína desacopladora (-1, -2 y -3)  
**UPR:** *unfolded protein response*  
**VLDL:** very low-density lipoprotein, proteínas de muy baja densidad  
**VMH:** núcleo ventromedial hipotalámico  
**VTA:** área tegmental ventral



**WAT:** tejido adiposo blanco

**Y-R:** receptor de NPY (Y1R, Y2R, Y3R, Y4R, Y5R, Y6R)

**$\alpha$ -MSH:** hormona estimuladora de melanocitos  $\alpha$

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









- Adachi,Y., Yamamoto,K., Okada,T., Yoshida,H., Harada,A., and Mori,K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct. Funct.* 33, 75-89.
- Akabayashi,A., Koenig,J.I., Watanabe,Y., Alexander,J.T., and Leibowitz,S.F. (1994). Galanin-containing neurons in the paraventricular nucleus: a neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 10375-10379.
- Alkemade,A. (2010). Central and peripheral effects of thyroid hormone signalling in the control of energy metabolism. *J. Neuroendocrinol.* 22, 56-63.
- Alkemade,A., Friesema,E.C., Unmehopa,U.A., Fabriek,B.O., Kuiper,G.G., Leonard,J.L., Wiersinga,W.M., Swaab,D.F., Visser,T.J., and Fliers,E. (2005). Neuroanatomical pathways for thyroid hormone feedback in the human hypothalamus. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 4322-4334.
- Alvarez-Crespo,M., Martinez-Sanchez,N., Ruiz-Pino,F., Garcia-Lavandeira,M., Alvarez,C.V., Tena-Sempere,M., Nogueiras,R., Dieguez,C., and Lopez,M. (2013). The orexigenic effect of orexin-A revisited: dependence of an intact growth hormone axis. *Endocrinology* 154, 3589-3598.
- 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.
- Aponte,Y., Atasoy,D., and Sternson,S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351-355.
- Aravich,P.F. and Sclafani,A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav. Neurosci.* 97, 970-983.
- Arendorf,A.M., Diedrichs,D., and Rutkowski,D.T. (2013). Regulation of the transcriptome by ER stress: non-canonical mechanisms and physiological consequences. *Front Genet.* 4, 256.
- Arrojo E Drigo and Bianco,A.C. (2011). Type 2 deiodinase at the crossroads of thyroid hormone action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 1432-1441.
- Arrojo E Drigo, Fonseca,T.L., Werneck-de-Castro,J.P., and Bianco,A.C. (2013). Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3956-3964.
- Arsenijevic,D., Onuma,H., Pecqueur,C., Raimbault,S., Manning,B.S., Miroux,B., Couplan,E., Alves-Guerra,M.C., Gubern,M., Surwit,R., Bouillaud,F., Richard,D., Collins,S., and Ricquier,D. (2000). Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26, 435-439.
- 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-R1578.
- Banks,W.A. (2001). Leptin transport across the blood-brain barrier: implications for the cause and treatment of obesity. *Curr. Pharm. Des* 7, 125-133.

## Bibliografía

- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., and Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311.
- Barsh, G.S., Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2000). Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404, 644-651.
- Barsh, G.S. and Schwartz, M.W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat. Rev. Genet.* 3, 589-600.
- Bartelt, A., Bruns, O.T., Reimer, R., Hohenberg, H., Itrich, H., Peldschus, K., Kaul, M.G., Tromsdorf, U.I., Weller, H., Waurisch, C., Eychmuller, A., Gordts, P.L., Rinninger, F., Bruegelmann, K., Freund, B., Nielsen, P., Merkel, M., and Heeren, J. (2011). Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat. Med.* 17, 200-205.
- Barthel, A. and Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285, E685-E692.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F., Bonigut, S., and Miller, M.A. (1999). Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting. *Brain Res.* 828, 154-158.
- Beiroa, D., Imbernon, M., Gallego, R., Senra, A., Herranz, D., Villarroya, F., Serrano, M., Ferno, J., Salvador, J., Escalada, J., Dieguez, C., Lopez, M., Fruhbeck, G., and Nogueiras, R. (2014). GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes* 63, 3346-3358.
- Belgardt, B.F., Mauer, J., and Bruning, J.C. (2010a). Novel roles for JNK1 in metabolism. *Aging (Albany. NY)* 2, 621-626.
- Belgardt, B.F., Mauer, J., Wunderlich, F.T., Ernst, M.B., Pal, M., Spohn, G., Bronneke, H.S., Brodesser, S., Hampel, B., Schauss, A.C., and Bruning, J.C. (2010b). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 6028-6033.
- Bennett, B.L., Satoh, Y., and Lewis, A.J. (2003). JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 420-425.
- 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., Niswender, K., Irani, B.G., Holland, W.L., and Clegg, D.J. (2009). Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- $\theta$  subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest* 119, 2577-2589.
- Bernardis, L.L., Awad, A., Fink, C., and Bellinger, L.L. (1992). Metabolic and neuroendocrine indices one month after lateral hypothalamic area lesions. *Physiol Behav.* 52, 133-139.
- Bernardis, L.L. and Bellinger, L.L. (1987). The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res.* 434, 321-381.
- 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.
- Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillon, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J.* 19, 1680-1682.

- Beylot,M., Martin,C., Laville,M., Riou,J.P., Cohen,R., and Mornex,R. (1991). Lipolytic and ketogenic fluxes in human hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 73, 42-49.
- Bi,S., Kim,Y.J., and Zheng,F. (2012). Dorsomedial hypothalamic NPY and energy balance control. *Neuropeptides* 46, 309-314.
- Bianco,A.C. (2011). Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology* 152, 3306-3311.
- Bianco,A.C. and Kim,B.W. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest* 116, 2571-2579.
- Bieber,L.L., Abraham,T., and Helmrath,T. (1972). A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal. Biochem.* 50, 509-518.
- Bikman,B.T. and Summers,S.A. (2011). Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest* 121, 4222-4230.
- Blanco Martinez de,M.P., Gonzalez,C.R., Saha,A.K., Martins,L., Dieguez,C., Vidal-Puig,A., Tena-Sempere,M., and Lopez,M. (2011). Hypothalamic AMP-activated protein kinase as a mediator of whole body energy balance. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 12, 127-140.
- Blennemann,B., Moon,Y.K., and Freake,H.C. (1992). Tissue-specific regulation of fatty acid synthesis by thyroid hormone. *Endocrinology* 130, 637-643.
- Boguszewski,C.L., Paz-Filho,G., and Velloso,L.A. (2010). Neuroendocrine body weight regulation: integration between fat tissue, gastrointestinal tract, and the brain. *Endokrynol. Pol.* 61, 194-206.
- Borg,M.L., Omran,S.F., Weir,J., Meikle,P.J., and Watt,M.J. (2012). Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. *J. Physiol* 590, 4377-4389.
- Boulant,J.A. (2000). Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin. Infect. Dis.* 31 Suppl 5, S157-S161.
- Brand,M.D., Brindle,K.M., Buckingham,J.A., Harper,J.A., Rolfe,D.F., and Stuart,J.A. (1999). The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 23 Suppl 6, S4-11.
- Brent,G.A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. *J. Clin. Invest* 122, 3035-3043.
- Broberger,C., De,L.L., Sutcliffe,J.G., and Hokfelt,T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp Neurol.* 402, 460-474.
- Bronnikov,G., Bengtsson,T., Kramarova,L., Golozoubova,V., Cannon,B., and Nedergaard,J. (1999). beta1 to beta3 switch in control of cyclic adenosine monophosphate during brown adipocyte development explains distinct beta-adrenoceptor subtype mediation of proliferation and differentiation. *Endocrinology* 140, 4185-4197.
- Bruinstroop,E., Fliers,E., and Kalsbeek,A. (2014). Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 28, 673-684.

- Budefeld,T., Tobet,S.A., and Majdic,G. (2012). Steroidogenic factor 1 and the central nervous system. *J. Neuroendocrinol.* 24, 225-235.
- Cakir,I., Cyr,N.E., Perello,M., Litvinov,B.P., Romero,A., Stuart,R.C., and Nillni,E.A. (2013). Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 288, 17675-17688.
- 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.
- Calle,E.E. and Kaaks,R. (2004). Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4, 579-591.
- Cannon,B. and Nedergaard,J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84, 277-359.
- Cannon,B. and Nedergaard,J. (2010). Thyroid hormones: igniting brown fat via the brain. *Nat. Med.* 16, 965-967.
- Carling,D., Sanders,M.J., and Woods,A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int. J. Obes. (Lond)* 32 *Suppl* 4, S55-S59.
- Carling,D., Zammit,V.A., and Hardie,D.G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* 223, 217-222.
- Casanueva,F.F. and Dieguez,C. (2002). Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 3, 325-338.
- 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.
- Challis,B.G., Coll,A.P., Yeo,G.S., Pinnock,S.B., Dickson,S.L., Thresher,R.R., Dixon,J., Zahn,D., Rochford,J.J., White,A., Oliver,R.L., Millington,G., Aparicio,S.A., Colledge,W.H., Russ,A.P., Carlton,M.B., and O'Rahilly,S. (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 4695-4700.
- Chang,L. and Karin,M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Chen,C.Y., Del Gatto-Konczak,F., Wu,Z., and Karin,M. (1998). Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science* 280, 1945-1949.
- Chen,L., Kwong,M., Lu,R., Ginzinger,D., Lee,C., Leung,L., and Chan,J.Y. (2003). Nrf1 is critical for redox balance and survival of liver cells during development. *Mol. Cell Biol.* 23, 4673-4686.
- Chen,Y., Hu,C., Hsu,C.K., Zhang,Q., Bi,C., Asnicar,M., Hsiung,H.M., Fox,N., Sliker,L.J., Yang,D.D., Heiman,M.L., and Shi,Y. (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.

Chmurzynska,A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J. Appl. Genet.* *47*, 39-48.

Christoffolete,M.A., Linardi,C.C., de,J.L., Ebina,K.N., Carvalho,S.D., Ribeiro,M.O., Rabelo,R., Curcio,C., Martins,L., Kimura,E.T., and Bianco,A.C. (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.

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., Speakman,J.R., Barsh,G.S., Viollet,B., Vaulont,S., Ashford,M.L., Carling,D., and Withers,D.J. (2007a). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J. Clin. Invest* *117*, 2325-2336.

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., Speakman,J.R., Barsh,G.S., Viollet,B., Vaulont,S., Ashford,M.L., Carling,D., and Withers,D.J. (2007b). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J. Clin. Invest* *117*, 2325-2336.

Clark,J.T., Kalra,P.S., Crowley,W.R., and Kalra,S.P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* *115*, 427-429.

Coffey,E.T. (2014). Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 285-299.

Coffey,E.T. and Courtney,M.J. (1997). Regulation of SAPKs in CNS neurons. *Biochem. Soc. Trans.* *25*, S568.

Coll,A.P., Farooqi,I.S., and O'Rahilly,S. (2007). The hormonal control of food intake. *Cell* *129*, 251-262.

Coll,A.P. and Yeo,G.S. (2013). The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.* *13*, 970-976.

Considine,R.V., Sinha,M.K., Heiman,M.L., Kriauciunas,A., Stephens,T.W., Nyce,M.R., Ohannesian,J.P., Marco,C.C., McKee,L.J., Bauer,T.L., and . (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* *334*, 292-295.

Contreras,C., Gonzalez,F., Ferno,J., Dieguez,C., Rahmouni,K., Nogueiras,R., and Lopez,M. (2014a). The brain and brown fat. *Ann. Med.* 1-19.

Contreras,C., Gonzalez-Garcia,I., Martinez-Sanchez,N., Seoane-Collazo,P., Jacas,J., Morgan,D.A., Serra,D., Gallego,R., Gonzalez,F., Casals,N., Nogueiras,R., Rahmouni,K., Dieguez,C., and Lopez,M. (2014b). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Rep.* *9*, 366-377.

Costa-e-Sousa RH and Hollenberg,A.N. (2012). Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* *153*, 4128-4135.

Costanzo-Garvey,D.L., Pfluger,P.T., Dougherty,M.K., Stock,J.L., Boehm,M., Chaika,O., Fernandez,M.R., Fisher,K., Kortum,R.L., Hong,E.G., Jun,J.Y., Ko,H.J., Schreiner,A.,

Volle,D.J., Treece,T., Swift,A.L., Winer,M., Chen,D., Wu,M., Leon,L.R., Shaw,A.S., McNeish,J., Kim,J.K., Morrison,D.K., Tschop,M.H., and Lewis,R.E. (2009). KSR2 is an essential regulator of AMP kinase, energy expenditure, and insulin sensitivity. *Cell Metab* 10, 366-378.

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.

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

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

Cowley,M.A., Smith,R.G., Diano,S., Tschop,M., Pronchuk,N., Grove,K.L., Strasburger,C.J., Bidlingmaier,M., Esterman,M., Heiman,M.L., Garcia-Segura,L.M., Nillni,E.A., Mendez,P., Low,M.J., Sotonyi,P., Friedman,J.M., Liu,H., Pinto,S., Colmers,W.F., Cone,R.D., and Horvath,T.L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.

Crocker,A.C. and FARBER,S. (1958). Niemann-Pick disease: a review of eighteen patients. *Medicine (Baltimore)* 37, 1-95.

Csaki,L.S. and Reue,K. (2010). Lipins: multifunctional lipid metabolism proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 30, 257-272.

Cummings,D.E., Weigle,D.S., Frayo,R.S., Breen,P.A., Ma,M.K., Dellinger,E.P., and Purnell,J.Q. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 346, 1623-1630.

Cunard,R. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in the Diabetic Kidney, the Good, the Bad and the Ugly. *J. Clin. Med.* 4, 715-740.

Cypess,A.M., Haft,C.R., Laughlin,M.R., and Hu,H.H. (2014). Brown fat in humans: consensus points and experimental guidelines. *Cell Metab* 20, 408-415.

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

Davis,R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

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.

Dhillon,W.S. and Bloom,S.R. (2001). Hypothalamic peptides as drug targets for obesity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1, 651-655.

Dhillon,H., Zigman,J.M., Ye,C., Lee,C.E., McGovern,R.A., Tang,V., Kenny,C.D., Christiansen,L.M., White,R.D., Edelstein,E.A., Coppari,R., Balthasar,N., Cowley,M.A., Chua S Jr, Elmquist,J.K., and Lowell,B.B. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49, 191-203.

- Dieguez,C., Fruhbeck,G., and Lopez,M. (2009). Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obes. Facts.* 2, 126-135.
- Dietrich,M.O. and Horvath,T.L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 36, 65-73.
- Dodd,G.T., Decherf,S., Loh,K., Simonds,S.E., Wiede,F., Bolland,E., Merry,T.L., Munzberg,H., Zhang,Z.Y., Kahn,B.B., Neel,B.G., Bence,K.K., Andrews,Z.B., Cowley,M.A., and Tiganis,T. (2015). Leptin and Insulin Act on POMC Neurons to Promote the Browning of White Fat. *Cell* 160, 88-104.
- Dowell,P., Hu,Z., and Lane,M.D. (2005). Monitoring energy balance: metabolites of fatty acid synthesis as hypothalamic sensors. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 515-534.
- Duivenvoorden,I., Teusink,B., Rensen,P.C., Romijn,J.A., Havekes,L.M., and Voshol,P.J. (2005). Apolipoprotein C3 deficiency results in diet-induced obesity and aggravated insulin resistance in mice. *Diabetes* 54, 664-671.
- Duntas,L.H. and Brenta,G. (2012). The effect of thyroid disorders on lipid levels and metabolism. *Med. Clin. North Am.* 96, 269-281.
- Dzamko,N., van Denderen,B.J., Hevener,A.L., Jorgensen,S.B., Honeyman,J., Galic,S., Chen,Z.P., Watt,M.J., Campbell,D.J., Steinberg,G.R., and Kemp,B.E. (2010). AMPK beta1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 285, 115-122.
- Egawa,M., Yoshimatsu,H., and Bray,G.A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am. J. Physiol* 260, R328-R334.
- 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., Aschkenasi,C., Lee,C., Kelly,J., Ahima,R.S., Bjorbaek,C., Flier,J.S., Saper,C.B., and Elmquist,J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.
- 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.
- ELLMAN,G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77.
- Elmquist,J.K., Ahima,R.S., Elias,C.F., Flier,J.S., and Saper,C.B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 741-746.
- Enerback,S., Jacobsson,A., Simpson,E.M., Guerra,C., Yamashita,H., Harper,M.E., and Kozak,L.P. (1997). Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* 387, 90-94.
- Erickson,J.C., Clegg,K.E., and Palmiter,R.D. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381, 415-421.
- Everitt,B.J. and Hokfelt,T. (1990). Neuroendocrine anatomy of the hypothalamus. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* 47, 1-15.

- Farmer,A. (2006). Metabolic syndrome and mortality. *BMJ* 332, 882.
- Farooqi,I.S. (2005). Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 19, 359-374.
- Farooqi,I.S., Keogh,J.M., Yeo,G.S., Lank,E.J., Cheetham,T., and O'Rahilly,S. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 348, 1085-1095.
- Farrell,G.C. and Larter,C.Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology* 43, S99-S112.
- Fekete,C., Kelly,J., Mihaly,E., Sarkar,S., Rand,W.M., Legradi,G., Emerson,C.H., and Lechan,R.M. (2001). Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142, 2606-2613.
- Fekete,C., Sarkar,S., Rand,W.M., Harney,J.W., Emerson,C.H., Bianco,A.C., Beck-Sickinger,A., and Lechan,R.M. (2002). Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 143, 4513-4519.
- Feldmann,H.M., Golozoubova,V., Cannon,B., and Nedergaard,J. (2009). UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9, 203-209.
- Feng,B., Yao,P.M., Li,Y., Devlin,C.M., Zhang,D., Harding,H.P., Sweeney,M., Rong,J.X., Kuriakose,G., Fisher,E.A., Marks,A.R., Ron,D., and Tabas,I. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781-792.
- Fenzl,A. and Kiefer,F.W. (2014). Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 19, 25-37.
- Fliers,E., Klieverik,L.P., and Kalsbeek,A. (2010a). Novel neural pathways for metabolic effects of thyroid hormone. *Trends Endocrinol. Metab* 21, 230-236.
- Fliers,E., Klieverik,L.P., and Kalsbeek,A. (2010b). Novel neural pathways for metabolic effects of thyroid hormone. *Trends Endocrinol. Metab* 21, 230-236.
- Flowers,M.T. and Ntambi,J.M. (2009). Stearoyl-CoA desaturase and its relation to high-carbohydrate diets and obesity. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 85-91.
- Fox,C.S., Pencina,M.J., D'Agostino,R.B., Murabito,J.M., Seely,E.W., Pearce,E.N., and Vasan,R.S. (2008). Relations of thyroid function to body weight: cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Arch. Intern. Med.* 168, 587-592.
- Franklyn,J.A. and Boelaert,K. (2012). Thyrotoxicosis. *Lancet* 379, 1155-1166.
- Fried,S.K., Leibel,R.L., Edens,N.K., and Kral,J.G. (1993). Lipolysis in intraabdominal adipose tissues of obese women and men. *Obes. Res.* 1, 443-448.
- 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.

- Fruhbeck,G. (2008). Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol. Biol.* *456*, 1-22.
- Fu,S., Watkins,S.M., and Hotamisligil,G.S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab* *15*, 623-634.
- Gao,S., Kinzig,K.P., Aja,S., Scott,K.A., Keung,W., Kelly,S., Strynadka,K., Chohnan,S., Smith,W.W., Tamashiro,K.L., Ladenheim,E.E., Ronnett,G.V., Tu,Y., Birnbaum,M.J., Lopaschuk,G.D., and Moran,T.H. (2007). Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 17358-17363.
- Gao,S. and Lane,M.D. (2003). Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 5628-5633.
- Gardner,B.M. and Walter,P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* *333*, 1891-1894.
- Garver,W.S., Jelinek,D., Oyarzo,J.N., Flynn,J., Zuckerman,M., Krishnan,K., Chung,B.H., and Heidenreich,R.A. (2007). Characterization of liver disease and lipid metabolism in the Niemann-Pick C1 mouse. *J. Cell Biochem.* *101*, 498-516.
- Gehlert,D.R., Chronwall,B.M., Schafer,M.P., and O'Donohue,T.L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* *1*, 25-31.
- Ghamari-Langroudi,M., Vella,K.R., Srisai,D., Sugrue,M.L., Hollenberg,A.N., and Cone,R.D. (2010). Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol. Endocrinol.* *24*, 2366-2381.
- Gibbons,G.F. (1990). Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. J.* *268*, 1-13.
- Gibbons,G.F., Islam,K., and Pease,R.J. (2000). Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim. Biophys. Acta* *1483*, 37-57.
- Gnoni,G.V., Landriscina,C., Ruggiero,F.M., and Quagliariello,E. (1983). Effect of hyperthyroidism on lipogenesis in brown adipose tissue of young rats. *Biochim. Biophys. Acta* *751*, 271-279.
- 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.
- 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.
- Graham,M., Shutter,J.R., Sarmiento,U., Sarosi,I., and Stark,K.L. (1997). Overexpression of *Agtr* leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* *17*, 273-274.
- Gupta,S., Campbell,D., Derijard,B., and Davis,R.J. (1995). Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* *267*, 389-393.
- Haffner,S.M. (2006). Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes. *Obesity. (Silver. Spring)* *14 Suppl 3*, 121S-127S.

- Hagan,J.J., Leslie,R.A., Patel,S., Evans,M.L., Wattam,T.A., Holmes,S., Benham,C.D., Taylor,S.G., Routledge,C., Hemmati,P., Munton,R.P., Ashmeade,T.E., Shah,A.S., Hatcher,J.P., Hatcher,P.D., Jones,D.N., Smith,M.I., Piper,D.C., Hunter,A.J., Porter,R.A., and Upton,N. (1999). Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 10911-10916.
- Hagenfeldt,L., Wennlung,A., Felig,P., and Wahren,J. (1981). Turnover and splanchnic metabolism of free fatty acids in hyperthyroid patients. *J. Clin. Invest* 67, 1672-1677.
- 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.
- Hara,J., Beuckmann,C.T., Nambu,T., Willie,J.T., Chemelli,R.M., Sinton,C.M., Sugiyama,F., Yagami,K., Goto,K., Yanagisawa,M., and Sakurai,T. (2001). Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30, 345-354.
- Hardie,D.G. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* 117, 5479-5487.
- Hardie,D.G. (2007). AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 185-210.
- 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.
- Harlan,S.M., Morgan,D.A., Agassandian,K., Guo,D.F., Cassell,M.D., Sigmund,C.D., Mark,A.L., and Rahmouni,K. (2011). Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. *Circ. Res.* 108, 808-812.
- Harrold,J.A., Widdowson,P.S., and Williams,G. (1999). Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* 48, 267-271.
- Hawley,S.A., Davison,M., Woods,A., Davies,S.P., Beri,R.K., Carling,D., and Hardie,D.G. (1996). Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 27879-27887.
- Hawley,S.A., Pan,D.A., Mustard,K.J., Ross,L., Bain,J., Edelman,A.M., Frenguelli,B.G., and Hardie,D.G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2, 9-19.
- Hayashi,T., Saito,A., Okuno,S., Ferrand-Drake,M., Dodd,R.L., and Chan,P.H. (2005). Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 41-53.
- 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.

- 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.
- Hernandez,A. and Obregon,M.J. (1996). Presence and mRNA expression of T3 receptors in differentiating rat brown adipocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 121, 37-46.
- Herwig,A., Ross,A.W., Nilaweera,K.N., Morgan,P.J., and Barrett,P. (2008). Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes. Facts.* 1, 71-79.
- 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-E344.
- Holland,W.L., Bikman,B.T., Wang,L.P., Yuguang,G., Sargent,K.M., Bulchand,S., Knotts,T.A., Shui,G., Clegg,D.J., Wenk,M.R., Pagliassotti,M.J., Scherer,P.E., and Summers,S.A. (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J. Clin. Invest* 121, 1858-1870.
- Holland,W.L. and Summers,S.A. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381-402.
- Holt,S.J., Wheal,H.V., and York,D.A. (1987). Hypothalamic control of brown adipose tissue in Zucker lean and obese rats. Effect of electrical stimulation of the ventromedial nucleus and other hypothalamic centres. *Brain Res.* 405, 227-233.
- Hosoi,T., Sasaki,M., Miyahara,T., Hashimoto,C., Matsuo,S., Yoshii,M., and Ozawa,K. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol. Pharmacol.* 74, 1610-1619.
- Hu,Y., Metzler,B., and Xu,Q. (1997). Discordant activation of stress-activated protein kinases or c-Jun NH2-terminal protein kinases in tissues of heat-stressed mice. *J. Biol. Chem.* 272, 9113-9119.
- Hu,Z., Cha,S.H., Chohnan,S., and Lane,M.D. (2003). Hypothalamic malonyl-CoA as a mediator of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 12624-12629.
- Hugie,T., Halvorson,I., and Thornhill,J. (1992). Brown adipose tissue temperature responses following electrical stimulation of ventromedial hypothalamic and lateral preoptic areas or after norepinephrine infusion to Long Evans or Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 575, 57-62.
- Hurley,R.L., Anderson,K.A., Franzone,J.M., Kemp,B.E., Means,A.R., and Witters,L.A. (2005). The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J. Biol. Chem.* 280, 29060-29066.
- Huszar,D., Lynch,C.A., Fairchild-Huntress,V., Dunmore,J.H., Fang,Q., Berkemeier,L.R., Gu,W., Kesterson,R.A., Boston,B.A., Cone,R.D., Smith,F.J., Campfield,L.A., Burn,P., and Lee,F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131-141.
- Iantorno,M., Campia,U., Di,D.N., Nistico,S., Forleo,G.B., Cardillo,C., and Tesauro,M. (2014). Gut hormones and endothelial dysfunction in patients with obesity and diabetes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27, 433-436.

Ilieva,E.V., Ayala,V., Jove,M., Dalfo,E., Cacabelos,D., Povedano,M., Bellmunt,M.J., Ferrer,I., Pamplona,R., and Portero-Otin,M. (2007). Oxidative and endoplasmic reticulum stress interplay in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 130, 3111-3123.

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., Al-Massadi,O., Varela,L., Gandara,M., Lopez-Soriano,F.J., Gallego,R., Seoane,L.M., Argiles,J.M., Lopez,M., Davis,R.J., Sabio,G., Rohner-Jeanrenaud,F., Rahmouni,K., Dieguez,C., and Nogueiras,R. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 144, 636-649.

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.

Ishii,S., Kamegai,J., Tamura,H., Shimizu,T., Sugihara,H., and Oikawa,S. (2008). Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regul. Pept.* 151, 164-169.

Iwen,K.A., Schroder,E., and Brabant,G. (2013). Thyroid hormones and the metabolic syndrome. *Eur. Thyroid J.* 2, 83-92.

Jo,Y.H. (2012). Endogenous BDNF regulates inhibitory synaptic transmission in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurophysiol.* 107, 42-49.

Johansson,C., Gothe,S., Forrest,D., Vennstrom,B., and Thoren,P. (1999). Cardiovascular phenotype and temperature control in mice lacking thyroid hormone receptor-beta or both alpha1 and beta. *Am. J. Physiol* 276, H2006-H2012.

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.

Kahn,B.B., Alquier,T., Carling,D., and Hardie,D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.

Kahn,S.E., Hull,R.L., and Utzschneider,K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840-846.

Kalra,S.P., Dube,M.G., Pu,S., Xu,B., Horvath,T.L., and Kalra,P.S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr. Rev.* 20, 68-100.

Kalsbeek,A., Bruinstroop,E., Yi,C.X., Klieverik,L.P., La Fleur,S.E., and Fliers,E. (2010). Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, 114-129.

Kalsbeek,A., La,F.S., Van,H.C., and Buijs,R.M. (2004). Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver. *J. Neurosci.* 24, 7604-7613.



- Kamegai,J., Tamura,H., Shimizu,T., Ishii,S., Sugihara,H., and Wakabayashi,I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438-2443.
- Kammoun,H.L., Chabanon,H., Hainault,I., Luquet,S., Magnan,C., Koike,T., Ferre,P., and Foufelle,F. (2009). GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J. Clin. Invest* 119, 1201-1215.
- Kaneto,H., Nakatani,Y., Miyatsuka,T., Kawamori,D., Matsuoka,T.A., Matsuhisa,M., Kajimoto,Y., Ichijo,H., Yamasaki,Y., and Hori,M. (2004). Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat. Med.* 10, 1128-1132.
- 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.
- Kim,B. (2008). Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* 18, 141-144.
- Kim,K.W., Zhao,L., Donato,J., Jr., Kohno,D., Xu,Y., Elias,C.F., Lee,C., Parker,K.L., and Elmquist,J.K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 10673-10678.
- King,B.M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 87, 221-244.
- Kishi,T., Aschkenasi,C.J., Lee,C.E., Mountjoy,K.G., Saper,C.B., and Elmquist,J.K. (2003). Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp Neurol.* 457, 213-235.
- Klein,I. and Ojamaa,K. (2001). Thyroid hormone-targeting the heart. *Endocrinology* 142, 11-12.
- Klieverik,L.P., Coomans,C.P., Endert,E., Sauerwein,H.P., Havekes,L.M., Voshol,P.J., Rensen,P.C., Romijn,J.A., Kalsbeek,A., and Fliers,E. (2009a). Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissue-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology* 150, 5639-5648.
- Klieverik,L.P., Janssen,S.F., van,R.A., Foppen,E., Bisschop,P.H., Serlie,M.J., Boelen,A., Ackermans,M.T., Sauerwein,H.P., Fliers,E., and Kalsbeek,A. (2009b). 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-E520.
- Knudsen,N., Laurberg,P., Rasmussen,L.B., Bulow,I., Perrild,H., Ovesen,L., and Jorgensen,T. (2005). Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 4019-4024.
- Kojima,M., Hosoda,H., Date,Y., Nakazato,M., Matsuo,H., and Kangawa,K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-660.
- Kola,B., Farkas,I., Christ-Crain,M., Wittmann,G., Lolli,F., Amin,F., Harvey-White,J., Liposits,Z., Kunos,G., Grossman,A.B., Fekete,C., and Korbonits,M. (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., and Korbonits,M. (2005). Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 25196-25201.

Komori,T., Morikawa,Y., Nanjo,K., and Senba,E. (2006). Induction of brain-derived neurotrophic factor by leptin in the ventromedial hypothalamus. *Neuroscience* 139, 1107-1115.

Konner,A.C., Janoschek,R., Plum,L., Jordan,S.D., Rother,E., Ma,X., Xu,C., Enriori,P., Hampel,B., Barsh,G.S., Kahn,C.R., Cowley,M.A., Ashcroft,F.M., and Bruning,J.C. (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.

Kozutsumi,Y., Segal,M., Normington,K., Gething,M.J., and Sambrook,J. (1988). The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 332, 462-464.

Kreier,F., Kap,Y.S., Mettenleiter,T.C., Van,H.C., van,d., V, Kalsbeek,A., Sauerwein,H.P., Fliers,E., Romijn,J.A., and Buijs,R.M. (2006). Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology* 147, 1140-1147.

Kristensen,P., Judge,M.E., Thim,L., Ribel,U., Christjansen,K.N., Wulff,B.S., Clausen,J.T., Jensen,P.B., Madsen,O.D., Vrang,N., Larsen,P.J., and Hastrup,S. (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., Davis,R.J., and Rakic,P. (2003). A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 15184-15189.

Lafontan,M. and Berlan,M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J. Lipid Res.* 34, 1057-1091.

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.

Lazar,M.A. (1993). Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr. Rev.* 14, 184-193.

- Lechan,R.M., Qi,Y., Berrodin,T.J., Davis,K.D., Schwartz,H.L., Strait,K.A., Oppenheimer,J.H., and Lazar,M.A. (1993). Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology* 132, 2461-2469.
- Lee,J. and Ozcan,U. (2014). Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J. Biol. Chem.* 289, 1203-1211.
- Lee,J.S., Lee,E.Y., and Lee,H.S. (2014a). Hypothalamic, feeding/arousal-related peptidergic projections to the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Brain Res.*
- 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,P., Werner,C.D., Kebebew,E., and Celi,F.S. (2014b). Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. *Int. J. Obes. (Lond)* 38, 170-176.
- 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.
- 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-S28.
- 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,Y.Z. and Davidowa,H. (2004). Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J. Neurosci. Res.* 77, 596-602.
- Lidell,M.E., Betz,M.J., and Enerback,S. (2014a). Brown adipose tissue and its therapeutic potential. *J. Intern. Med.* 276, 364-377.
- Lidell,M.E., Betz,M.J., and Enerback,S. (2014b). Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte.* 3, 63-66.
- Liedtke,C. and Trautwein,C. (2006). The role of JNK2 in toxic liver injury. *J. Hepatol.* 45, 762-764.
- Lipson,K.L., Fonseca,S.G., Ishigaki,S., Nguyen,L.X., Foss,E., Bortell,R., Rossini,A.A., and Urano,F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4, 245-254.
- Little,J.W. (2006a). Thyroid disorders. Part I: hyperthyroidism. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 101, 276-284.
- Little,J.W. (2006b). Thyroid disorders. Part II: hypothyroidism and thyroiditis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 102, 148-153.
- Liu,X., Rossmeisl,M., McClaine,J., Riachi,M., Harper,M.E., and Kozak,L.P. (2003). Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J. Clin. Invest* 111, 399-407.

## Bibliografía

- Loftus, T.M., Jaworsky, D.E., Frehywot, G.L., Townsend, C.A., Ronnett, G.V., Lane, M.D., and Kuhajda, F.P. (2000). Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors. *Science* 288, 2379-2381.
- Long, Y.C. and Zierath, J.R. (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest* 116, 1776-1783.
- 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., Deoliveira, R.M., Castaneda, T., Datta, R., Dong, J.Z., Culler, M., Sleeman, M.W., Alvarez, C.V., Gallego, R., Lelliott, C.J., Carling, D., Tschop, M.H., Dieguez, C., and Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab* 7, 389-399.
- Lopez, M., Lelliott, C.J., Tovar, S., Kimber, W., Gallego, R., Virtue, S., Blount, M., Vazquez, M.J., Finan, N., Powles, T.J., O'Rahilly, S., Saha, A.K., Dieguez, C., and Vidal-Puig, A.J. (2006). Tamoxifen-induced anorexia is associated with fatty acid synthase inhibition in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and accumulation of malonyl-CoA. *Diabetes* 55, 1327-1336.
- Lopez, M., Lelliott, C.J., and Vidal-Puig, A. (2007a). Hypothalamic fatty acid metabolism: a housekeeping pathway that regulates food intake. *Bioessays* 29, 248-261.
- 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., Tena-Sempere, M., and Dieguez, C. (2010a). Cross-talk between orexins (hypocretins) and the neuroendocrine axes (hypothalamic-pituitary axes). *Front Neuroendocrinol.* 31, 113-127.
- 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., Martinez de Morentin, P.B., Tovar, S., Nogueiras, R., Carling, D., Lelliott, C., Gallego, R., Oresic, M., Chatterjee, K., Saha, A.K., Rahmouni, K., Dieguez, C., and Vidal-Puig, A. (2010b). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. *Nat. Med.* 16, 1001-1008.
- Lopez-Valpuesta, F.J., Nyce, J.W., Griffin-Biggs, T.A., Ice, J.C., and Myers, R.D. (1996). Antisense to NPY-Y1 demonstrates that Y1 receptors in the hypothalamus underlie NPY hypothermia and feeding in rats. *Proc. Biol. Sci.* 263, 881-886.
- Lowell, B.B. and Flier, J.S. (1997). Brown adipose tissue, beta 3-adrenergic receptors, and obesity. *Annu. Rev. Med.* 48, 307-316.
- Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.
- Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310, 683-685.

- Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., and Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 15239-15244.
- 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.
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., and Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* *143*, 607-614.
- Manieri, E. and Sabio, G. (2015). Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* *55*, R11-R22.
- Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Iwasaki-Sekino, A., Nemoto, T., and Shibasaki, T. (2009). Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J. Endocrinol.* *201*, 341-349.
- Marks, J.L., Porte, D., Jr., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* *127*, 3234-3236.
- Marra, F., Gastaldelli, A., Svegliati, B.G., Tell, G., and Tiribelli, C. (2008). Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends Mol. Med.* *14*, 72-81.
- 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.
- Marsh, D.J., Miura, G.I., Yagaloff, K.A., Schwartz, M.W., Barsh, G.S., and Palmiter, R.D. (1999). Effects of neuropeptide Y deficiency on hypothalamic agouti-related protein expression and responsiveness to melanocortin analogues. *Brain Res.* *848*, 66-77.
- Marsili, A., Aguayo-Mazzucato, C., Chen, T., Kumar, A., Chung, M., Lunsford, E.P., Harney, J.W., Van-Tran, T., Gianetti, E., Ramadan, W., Chou, C., Bonner-Weir, S., Larsen, P.R., Silva, J.E., and Zavacki, A.M. (2011). Mice with a targeted deletion of the type 2 deiodinase are insulin resistant and susceptible to diet induced obesity. *PLoS. One.* *6*, e20832.
- 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 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., Gallego, R., Saha, A.K., Kalsbeek, A., Fliers, E., Bisschop, P.H., Dieguez, C., Nogueiras, R., Rahmouni, K., Tena-Sempere, M., and Lopez, M. (2014a). Estradiol regulates brown adipose tissue thermogenesis via hypothalamic AMPK. *Cell Metab* *20*, 41-53.
- 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.

## Bibliografía

- Martinez de Morentin,P.B., Whittle,A.J., Ferno,J., Nogueiras,R., Dieguez,C., Vidal-Puig,A., and Lopez,M. (2012a). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 61, 807-817.
- Martinez de Morentin,P.B., Whittle,A.J., Ferno,J., Nogueiras,R., Dieguez,C., Vidal-Puig,A., and Lopez,M. (2012b). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 61, 807-817.
- Martinez-Sanchez,N., Alvarez,C.V., Ferno,J., Nogueiras,R., Dieguez,C., and Lopez,M. (2014). Hypothalamic effects of thyroid hormones on metabolism. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab* 28, 703-712.
- Mason,T.M. (1998). The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes. *Crit Rev. Clin. Lab Sci.* 35, 461-487.
- Matus,S., Lisbona,F., Torres,M., Leon,C., Thielen,P., and Hetz,C. (2008). The stress rheostat: an interplay between the unfolded protein response (UPR) and autophagy in neurodegeneration. *Curr. Mol. Med.* 8, 157-172.
- McClellan,K.M., Parker,K.L., and Tobet,S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 27, 193-209.
- McCrimmon,R.J., Shaw,M., Fan,X., Cheng,H., Ding,Y., Vella,M.C., Zhou,L., McNay,E.C., and Sherwin,R.S. (2008). Key role for AMP-activated protein kinase in the ventromedial hypothalamus in regulating counterregulatory hormone responses to acute hypoglycemia. *Diabetes* 57, 444-450.
- McGarry,J.D., Stark,M.J., and Foster,D.W. (1978). Hepatic malonyl-CoA levels of fed, fasted and diabetic rats as measured using a simple radioisotopic assay. *J. Biol. Chem.* 253, 8291-8293.
- Mebis,L. and Van den Berghe,G. (2009a). The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness. *Neth. J. Med.* 67, 332-340.
- Mebis,L. and Van den Berghe,G. (2009b). 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.
- Medina-Gomez,G. and Vidal-Puig,A. (2005). Gateway to the metabolic syndrome. *Nat. Med.* 11, 602-603.
- Medina-Gomez,G., Virtue,S., Lelliott,C., Boiani,R., Campbell,M., Christodoulides,C., Perrin,C., Jimenez-Linan,M., Blount,M., Dixon,J., Zahn,D., Thresher,R.R., Aparicio,S., Carlton,M., Colledge,W.H., Kettunen,M.I., Seppanen-Laakso,T., Sethi,J.K., O'Rahilly,S., Brindle,K., Cinti,S., Oresic,M., Burcelin,R., and Vidal-Puig,A. (2005). The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diabetes* 54, 1706-1716.

- Menendez, J.A., Vazquez-Martin, A., Ortega, F.J., and Fernandez-Real, J.M. (2009). Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. *Clin. Chem.* 55, 425-438.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Morgan, P.J., and Trayhurn, P. (1996a). Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 8, 733-735.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., and Trayhurn, P. (1996b). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* 387, 113-116.
- Millhouse, O.E. (1978). Cytological observations on the ventromedial hypothalamic nucleus. *Cell Tissue Res.* 191, 473-491.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., and Kahn, B.B. (2004a). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Fofelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J., and Kahn, B.B. (2004b). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569-574.
- Minokoshi, Y., Shiuchi, T., Lee, S., Suzuki, A., and Okamoto, S. (2008). Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation. *Nutrition* 24, 786-790.
- Miranda, M., Chacon, M.R., Gomez, J., Megia, A., Ceperuelo-Mallafre, V., Veloso, S., Saumoy, M., Gallart, L., Richart, C., Fernandez-Real, J.M., and Vendrell, J. (2007). Human subcutaneous adipose tissue LPIN1 expression in obesity, type 2 diabetes mellitus, and human immunodeficiency virus--associated lipodystrophy syndrome. *Metabolism* 56, 1518-1526.
- Mlinar, B., Pfeifer, M., Vrtacnik-Bokal, E., Jensterle, M., and Marc, J. (2008). Decreased lipin 1 beta expression in visceral adipose tissue is associated with insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 159, 833-839.
- 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.
- Morrison, S.F. (1999). RVLN and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* 276, R962-R973.
- Morrison, S.F. and Madden, C.J. (2014). Central nervous system regulation of brown adipose tissue. *Compr. Physiol* 4, 1677-1713.
- Morrison, S.F., Madden, C.J., and Tupone, D. (2012). Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol. (Lausanne)* 3.
- Morrison, S.F., Madden, C.J., and Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab* 19, 741-756.
- Morrison, W.R. and Smith, L.M. (1964). preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride--methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600-608.
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289-295.

- Mullur,R., Liu,Y.Y., and Brent,G.A. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev.* 94, 355-382.
- Murphy,M. and Ebling,F.J. (2011). The role of hypothalamic tri-iodothyronine availability in seasonal regulation of energy balance and body weight. *J. Thyroid Res.* 2011, 387562.
- Nakamura,K. and Morrison,S.F. (2008). Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *J. Physiol* 586, 2611-2620.
- Nakatani,Y., Kaneto,H., Kawamori,D., Hatazaki,M., Miyatsuka,T., Matsuoka,T.A., Kajimoto,Y., Matsuhisa,M., Yamasaki,Y., and Hori,M. (2004). Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. *J. Biol. Chem.* 279, 45803-45809.
- Nedergaard,J., Alexson,S., and Cannon,B. (1980). Cold adaptation in the rat: increased brown fat peroxisomal beta-oxidation relative to maximal mitochondrial oxidative capacity. *Am. J. Physiol* 239, C208-C216.
- 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-E452.
- Nedergaard,J. and Cannon,B. (1984). Preferential utilization of brown adipose tissue lipids during arousal from hibernation in hamsters. *Am. J. Physiol* 247, R506-R512.
- 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., Herzog,H., and Sainsbury,A. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS. One.* 7, e40191.
- Noble,E.E., Billington,C.J., Kotz,C.M., and Wang,C. (2014). Oxytocin in the ventromedial hypothalamic nucleus reduces feeding and acutely increases energy expenditure. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 307, R737-R745.
- Novelle,M.G., Contreras,C., Romero-Pico,A., Lopez,M., and Dieguez,C. (2013). Irisin, two years later. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 746281.
- Obici,S., Feng,Z., Arduini,A., Conti,R., and Rossetti,L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat. Med.* 9, 756-761.
- 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.
- Olney,J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
- Orava,J., Nuutila,P., Lidell,M.E., Oikonen,V., Noponen,T., Viljanen,T., Scheinin,M., Taittonen,M., Niemi,T., Enerback,S., and Virtanen,K.A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab* 14, 272-279.
- Ouellet,V., Labbe,S.M., Blondin,D.P., Phoenix,S., Guerin,B., Haman,F., Turcotte,E.E., Richard,D., and Carpentier,A.C. (2012). Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J. Clin. Invest* 122, 545-552.



- Ozcan,L., Ergin,A.S., Lu,A., Chung,J., Sarkar,S., Nie,D., Myers,M.G., Jr., and Ozcan,U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 9, 35-51.
- Ozcan,U., Cao,Q., Yilmaz,E., Lee,A.H., Iwakoshi,N.N., Ozdelen,E., Tuncman,G., Gorgun,C., Glimcher,L.H., and Hotamisligil,G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.
- Ozcan,U., Yilmaz,E., Ozcan,L., Furuhashi,M., Vaillancourt,E., Smith,R.O., Gorgun,C.Z., and Hotamisligil,G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313, 1137-1140.
- Palkovits,M. (2003). Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyogy. Sz* 56, 288-302.
- Park,S.W. and Ozcan,U. (2013). Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Semin. Immunopathol.* 35, 351-373.
- Pearce,E.N. (2012). Thyroid hormone and obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 19, 408-413.
- Pelleymounter,M.A., Cullen,M.J., and Wellman,C.L. (1995). Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp. Neurol.* 131, 229-238.
- Pereira-da-Silva,M., Torsoni,M.A., Nourani,H.V., Augusto,V.D., Souza,C.T., Gasparetti,A.L., Carneiro,E.M., and Velloso,L.A. (2003). Hypothalamic melanin-concentrating hormone is induced by cold exposure and participates in the control of energy expenditure in rats. *Endocrinology* 144, 4831-4840.
- 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.
- Peterfy,M., Phan,J., Xu,P., and Reue,K. (2001). Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat. Genet.* 27, 121-124.
- 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., and Meinders,A.E. (2001). Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 5848-5853.
- Pocai,A., Lam,T.K., Gutierrez-Juarez,R., Obici,S., Schwartz,G.J., Bryan,J., Aguilar-Bryan,L., and Rossetti,L. (2005). Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434, 1026-1031.
- Polonsky,K.S., Given,B.D., and Van,C.E. (1988). Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest* 81, 442-448.
- Ponticos,M., Lu,Q.L., Morgan,J.E., Hardie,D.G., Partridge,T.A., and Carling,D. (1998). Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *EMBO J.* 17, 1688-1699.

Porte,D., Jr., Baskin,D.G., and Schwartz,M.W. (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* 54, 1264-1276.

Prada,P.O., Coelho,M.S., Zecchin,H.G., Dolnikoff,M.S., Gasparetti,A.L., Furukawa,L.N., Saad,M.J., and Heimann,J.C. (2005a). Low salt intake modulates insulin signaling, JNK activity and IRS-1ser307 phosphorylation in rat tissues. *J. Endocrinol.* 185, 429-437.

Prada,P.O., Zecchin,H.G., Gasparetti,A.L., Torsoni,M.A., Ueno,M., Hirata,A.E., Corezola do Amaral,M.E., Hoer,N.F., Boschero,A.C., and Saad,M.J. (2005b). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 146, 1576-1587.

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.

Qi,J., Gong,J., Zhao,T., Zhao,J., Lam,P., Ye,J., Li,J.Z., Wu,J., Zhou,H.M., and Li,P. (2008). Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J.* 27, 1537-1548.

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.

Rahmouni,K., Sigmund,C.D., Haynes,W.G., and Mark,A.L. (2009). Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 58, 536-542.

Raichur,S., Wang,S.T., Chan,P.W., Li,Y., Ching,J., Chaurasia,B., Dogra,S., Ohman,M.K., Takeda,K., Sugii,S., Pewzner-Jung,Y., Futerman,A.H., and Summers,S.A. (2014). CerS2 haploinsufficiency inhibits beta-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance. *Cell Metab* 20, 687-695.

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

Ramirez,S., Martins,L., Jacas,J., Carrasco,P., Pozo,M., Clotet,J., Serra,D., Hegardt,F.G., Dieguez,C., Lopez,M., and Casals,N. (2013). Hypothalamic ceramide levels regulated by CPT1C mediate the orexigenic effect of ghrelin. *Diabetes* 62, 2329-2337.

Ravussin,E., Tschop,M., Morales,S., Bouchard,C., and Heiman,M.L. (2001). Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 86, 4547-4551.

Renaud,L.P. and Martin,J.B. (1975). Electrophysiological studies of connections of hypothalamic ventromedial nucleus neurons in the rat: evidence for a role in neuroendocrine regulation. *Brain Res.* 93, 145-151.

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.

Ribeiro,M.O., Carvalho,S.D., Schultz,J.J., Chiellini,G., Scanlan,T.S., Bianco,A.C., and Brent,G.A. (2001). Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J. Clin. Invest* 108, 97-105.

- Ribeiro,M.O., Lebrun,F.L., Christoffolete,M.A., Branco,M., Crescenzi,A., Carvalho,S.D., Negrao,N., and Bianco,A.C. (2000). Evidence of UCP1-independent regulation of norepinephrine-induced thermogenesis in brown fat. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 279, E314-E322.
- Ricquier,D. (2005). Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc. Nutr. Soc.* 64, 47-52.
- Riis,A.L., Gravholt,C.H., Djurhuus,C.B., Norrelund,H., Jorgensen,J.O., Weeke,J., and Moller,N. (2002). Elevated regional lipolysis in hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 87, 4747-4753.
- Rios,M., Fan,G., Fekete,C., Kelly,J., Bates,B., Kuehn,R., Lechan,R.M., and Jaenisch,R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol. Endocrinol.* 15, 1748-1757.
- Robidoux,J., Martin,T.L., and Collins,S. (2004). Beta-adrenergic receptors and regulation of energy expenditure: a family affair. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 297-323.
- Rohner-Jeanrenaud,F., Walker,C.D., Greco-Perotto,R., and Jeanrenaud,B. (1989). Central corticotropin-releasing factor administration prevents the excessive body weight gain of genetically obese (fa/fa) rats. *Endocrinology* 124, 733-739.
- Roman,S., Agil,A., Peran,M., Alvaro-Galue,E., Ruiz-Ojeda,F.J., Fernandez-Vazquez,G., and Marchal,J.A. (2014). Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl. Res.*
- Rossner,S. (2002). Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 26 *Suppl* 4, S2-S4.
- Ruderman,N.B., Saha,A.K., and Kraegen,E.W. (2003). Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology* 144, 5166-5171.
- Rutkowski,D.T. and Hegde,R.S. (2010). Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J. Cell Biol.* 189, 783-794.
- Sabio,G., Cavanagh-Kyros,J., Barrett,T., Jung,D.Y., Ko,H.J., Ong,H., Morel,C., Mora,A., Reilly,J., Kim,J.K., and Davis,R.J. (2010a). Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. *Genes Dev.* 24, 256-264.
- Sabio,G., Cavanagh-Kyros,J., Ko,H.J., Jung,D.Y., Gray,S., Jun,J.Y., Barrett,T., Mora,A., Kim,J.K., and Davis,R.J. (2009). Prevention of steatosis by hepatic JNK1. *Cell Metab* 10, 491-498.
- Sabio,G., Das,M., Mora,A., Zhang,Z., Jun,J.Y., Ko,H.J., Barrett,T., Kim,J.K., and Davis,R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. *Science* 322, 1539-1543.
- Sabio,G. and Davis,R.J. (2010). cJun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): roles in metabolic regulation of insulin resistance. *Trends Biochem. Sci.* 35, 490-496.
- Sabio,G. and Davis,R.J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin. Immunol.* 26, 237-245.

Sabio,G., Kennedy,N.J., Cavanagh-Kyros,J., Jung,D.Y., Ko,H.J., Ong,H., Barrett,T., Kim,J.K., and Davis,R.J. (2010b). Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance. *Mol. Cell Biol.* 30, 106-115.

Saha,A.K., Kurowski,T.G., and Ruderman,N.B. (1995). A malonyl-CoA fuel-sensing mechanism in muscle: effects of insulin, glucose, and denervation. *Am. J. Physiol* 269, E283-E289.

Sahu,A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol.* 24, 225-253.

Sahu,A., Dube,M.G., Phelps,C.P., Sninsky,C.A., Kalra,P.S., and Kalra,S.P. (1995). Insulin and insulin-like growth factor II suppress neuropeptide Y release from the nerve terminals in the paraventricular nucleus: a putative hypothalamic site for energy homeostasis. *Endocrinology* 136, 5718-5724.

Sakaguchi,T. and Bray,G.A. (1989). Effect of norepinephrine, serotonin and tryptophan on the firing rate of sympathetic nerves. *Brain Res.* 492, 271-280.

Sakurai,T., Amemiya,A., Ishii,M., Matsuzaki,I., Chemelli,R.M., Tanaka,H., Williams,S.C., Richardson,J.A., Kozlowski,G.P., Wilson,S., Arch,J.R., Buckingham,R.E., Haynes,A.C., Carr,S.A., Annan,R.S., McNulty,D.E., Liu,W.S., Terrett,J.A., Elshourbagy,N.A., Bergsma,D.J., and Yanagisawa,M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.

Sam,A.H., Troke,R.C., Tan,T.M., and Bewick,G.A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63, 46-56.

Samad,F., Hester,K.D., Yang,G., Hannun,Y.A., and Bielawski,J. (2006). Altered adipose and plasma sphingolipid metabolism in obesity: a potential mechanism for cardiovascular and metabolic risk. *Diabetes* 55, 2579-2587.

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.

Sandoval,D., Cota,D., and Seeley,R.J. (2008). The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu. Rev. Physiol* 70, 513-535.

Satinoff,E., Valentino,D., and Teitelbaum,P. (1976). Thermoregulatory cold-defense deficits in rats with preoptic/anterior hypothalamic lesions. *Brain Res. Bull.* 1, 553-565.

Sawai,H. and Hannun,Y.A. (1999). Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses. *Chem. Phys. Lipids* 102, 141-147.

Schneeberger,M., Dietrich,M.O., Sebastian,D., Imbernon,M., Castano,C., Garcia,A., Esteban,Y., Gonzalez-Franquesa,A., Rodriguez,I.C., Bortolozzi,A., Garcia-Roves,P.M., Gomis,R., Nogueiras,R., Horvath,T.L., Zorzano,A., and Claret,M. (2013). Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell* 155, 172-187.

Schneeberger,M., Gomis,R., and Claret,M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J. Endocrinol.* 220, T25-T46.

Schroder,M. and Kaufman,R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 739-789.

- Schwartz,M.W. and Porte,D., Jr. (2005). Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307, 375-379.
- Schwartz,M.W., Prigeon,R.L., Kahn,S.E., Nicolson,M., Moore,J., Morawiecki,A., Boyko,E.J., and Porte,D., Jr. (1997). Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care* 20, 1476-1481.
- Schwartz,M.W., Sipols,A.J., Marks,J.L., Sanacora,G., White,J.D., Scheurink,A., Kahn,S.E., Baskin,D.G., Woods,S.C., Figlewicz,D.P., and . (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608-3616.
- 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., Tempst,P., Rudnicki,M.A., Beier,D.R., and Spiegelman,B.M. (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., Parker,K.L., and Friedman,J.M. (2005). Use of laser-capture microdissection for the identification of marker genes for the ventromedial hypothalamic nucleus. *J. Neurosci.* 25, 4181-4188.
- Seo,S., Ju,S., Chung,H., Lee,D., and Park,S. (2008). Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocr. J.* 55, 867-874.
- 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., and Kajimura,S. (2012). Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS. One.* 7, e49452.
- Shen,J., Chen,X., Hendershot,L., and Prywes,R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev. Cell* 3, 99-111.
- Shi,Y.C., Lau,J., Lin,Z., Zhang,H., Zhai,L., Sperk,G., Heilbronn,R., Mietzsch,M., Weger,S., Huang,X.F., Enriquez,R.F., Baldock,P.A., Zhang,L., Sainsbury,A., Herzog,H., and Lin,S. (2013). Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab* 17, 236-248.
- Shimogawa,Y., Sakuma,Y., and Yamanouchi,K. (2014). Efferent and afferent connections of the ventromedial hypothalamic nucleus determined by neural tracer analysis: Implications for lordosis regulation in female rats. *Neurosci. Res.*
- Shintani,M., Ogawa,Y., Ebihara,K., Aizawa-Abe,M., Miyanaga,F., Takaya,K., Hayashi,T., Inoue,G., Hosoda,K., Kojima,M., Kangawa,K., and Nakao,K. (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action

through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 227-232.

Silva, J.E. (1995). Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5, 481-492.

Silva, J.E. (2003). The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann. Intern. Med.* 139, 205-213.

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.

Singh, M. (2014). Mood, food, and obesity. *Front Psychol.* 5, 925.

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.

Sobrino, C.C., Perianes, C.A., Puebla, J.L., Barrios, V., and Arilla, F.E. (2014). Peptides and food intake. *Front Endocrinol. (Lausanne)* 5, 58.

Spiegelman, B.M. and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.

Srividya, R., Mallick, H.N., and Kumar, V.M. (2006). Differences in the effects of medial and lateral preoptic lesions on thermoregulation and sleep in rats. *Neuroscience* 139, 853-864.

Stark, R., Ashley, S.E., and Andrews, Z.B. (2013). AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol. Cell Endocrinol.* 366, 215-223.

Ste, M.L., Luquet, S., Cole, T.B., and Palmiter, R.D. (2005). Modulation of neuropeptide Y expression in adult mice does not affect feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 18632-18637.

Steinberg, G.R., Macaulay, S.L., Febbraio, M.A., and Kemp, B.E. (2006a). AMP-activated protein kinase--the fat controller of the energy railroad. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 84, 655-665.

Steinberg, G.R., Michell, B.J., van Denderen, B.J., Watt, M.J., Carey, A.L., Fam, B.C., Andrikopoulos, S., Proietto, J., Gorgun, C.Z., Carling, D., Hotamisligil, G.S., Febbraio, M.A., Kay, T.W., and Kemp, B.E. (2006b). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 4, 465-474.

Stone, S.J., Myers, H.M., Watkins, S.M., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Farese, R.V., Jr. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 279, 11767-11776.

Summers, S.A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res.* 45, 42-72.

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., Pei, H., Burnett, K.H., Myers, M.G., Jr., Rhodes, C.J., and Olson, D.P. (2014). Control of food intake and energy expenditure by *Nos1* neurons of the paraventricular hypothalamus. *J. Neurosci.* *34*, 15306-15318.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Wool, E.A., Monroe, C.A., and Tepper, R.I. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* *83*, 1263-1271.
- 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.
- 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.
- Thompson, R.H., Canteras, N.S., and Swanson, L.W. (1996). Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J. Comp Neurol.* *376*, 143-173.
- Thornhill, J. and Halvorson, I. (1994). Activation of shivering and non-shivering thermogenesis by electrical stimulation of the lateral and medial preoptic areas. *Brain Res.* *656*, 367-374.
- Thornhill, J., Jugnauth, A., and Halvorson, I. (1994). Brown adipose tissue thermogenesis evoked by medial preoptic stimulation is mediated via the ventromedial hypothalamic nucleus. *Can. J. Physiol Pharmacol.* *72*, 1042-1048.
- Thorsell, A. and Heilig, M. (2002). Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals. *Neuropeptides* *36*, 182-193.
- 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.
- Toda, C., Shiuchi, T., Lee, S., Yamato-Esaki, M., Fujino, Y., Suzuki, A., Okamoto, S., and Minokoshi, Y. (2009). Distinct effects of leptin and a melanocortin receptor agonist injected into medial hypothalamic nuclei on glucose uptake in peripheral tissues. *Diabetes* *58*, 2757-2765.
- Tokunaga, K., Fukushima, M., Kemnitz, J.W., and Bray, G.A. (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am. J. Physiol* *251*, R1221-R1227.
- Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., Choi, C.S., Zigman, J.M., Shulman, G.I., Sherwin, R.S., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab* *5*, 383-393.
- Townsend, K.L. and Tseng, Y.H. (2014). Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.*
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., and Schutz, G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* *23*, 99-103.
- Tsaousidou, E., Paeger, L., Belgardt, B.F., Pal, M., Wunderlich, C.M., Bronneke, H., Collienne, U., Hampel, B., Wunderlich, F.T., Schmidt-Supprian, M., Kloppenburg, P., and Bruning, J.C. (2014).

Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. *Cell Rep.* 9, 1495-1506.

Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E., and Heiman, M.L. (2001). Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50, 707-709.

Tuncman, G., Hirosumi, J., Solinas, G., Chang, L., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2006). Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 10741-10746.

Turpin, S.M., Nicholls, H.T., Willmes, D.M., Mourier, A., Brodesser, S., Wunderlich, C.M., Mauer, J., Xu, E., Hammerschmidt, P., Bronneke, H.S., Trifunovic, A., LoSasso, G., Wunderlich, F.T., Kornfeld, J.W., Bluher, M., Kronke, M., and Bruning, J.C. (2014). Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab* 20, 678-686.

Unger, E.K., Piper, M.L., Olofsson, L.E., and Xu, A.W. (2010). Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. *Endocrinology* 151, 671-682.

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

Unger, R.H. (2003). The physiology of cellular liporegulation. *Annu. Rev. Physiol* 65, 333-347.

Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B., and Froguel, P. (1998). A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet.* 20, 113-114.

Van den Hoek, A.M., Van, H.C., Schroder-van der Elst, J.P., Ouwens, D.M., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Kalsbeek, A., and Pijl, H. (2008). Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y induces hepatic insulin resistance via sympathetic innervation. *Diabetes* 57, 2304-2310.

Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommel, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500-1508.

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., Dieguez, C., and Lopez, M. (2012). Hypothalamic mTOR pathway mediates thyroid hormone-induced hyperphagia in hyperthyroidism. *J. Pathol.* 227, 209-222.

Vazquez, M.J., Gonzalez, C.R., Varela, L., Lage, R., Tovar, S., Sangiao-Alvarellos, S., Williams, L.M., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., Lopez, M., and Dieguez, C. (2008). Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* 149, 4534-4543.

Verty, A.N., Allen, A.M., and Oldfield, B.J. (2010). The endogenous actions of hypothalamic peptides on brown adipose tissue thermogenesis in the rat. *Endocrinology* 151, 4236-4246.

Vidal-Puig, A.J., Grujic, D., Zhang, C.Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D.M., and Lowell, B.B. (2000). Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 16258-16266.



- Vijgen,G.H., Bouvy,N.D., Leenen,L., Rijkers,K., Cornips,E., Majoie,M., Brans,B., and van Marken Lichtenbelt,W.D. (2013). Vagus nerve stimulation increases energy expenditure: relation to brown adipose tissue activity. *PLoS. One.* 8, e77221.
- Viollet,B., Andreelli,F., Jorgensen,S.B., Perrin,C., Geloën,A., Flamez,D., Mu,J., Lenzner,C., Baud,O., Bennoun,M., Gomas,E., Nicolas,G., Wojtaszewski,J.F., Kahn,A., Carling,D., Schuit,F.C., Birnbaum,M.J., Richter,E.A., Burcelin,R., and Vaulont,S. (2003). The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest* 111, 91-98.
- Virtue,S. and Vidal-Puig,A. (2008). It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS. Biol.* 6, e237.
- 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.
- Visser,W.E. and Visser,T.J. (2012). Finding the way into the brain without MCT8. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 97, 4362-4365.
- Volpe,J.J. and Kishimoto,Y. (1972). Fatty acid synthetase of brain: development, influence of nutritional and hormonal factors and comparison with liver enzyme. *J. Neurochem.* 19, 737-753.
- Wakil,S.J. and Abu-Elheiga,L.A. (2009). Fatty acid metabolism: target for metabolic syndrome. *J. Lipid Res.* 50 *Suppl*, S138-S143.
- Walter,P. and Ron,D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081-1086.
- Wang,C., Billington,C.J., Levine,A.S., and Kotz,C.M. (2000). Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* 11, 3251-3255.
- Wang,H. and Eckel,R.H. (2009). Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 297, E271-E288.
- Wang,J. and Leibowitz,K.L. (1997). Central insulin inhibits hypothalamic galanin and neuropeptide Y gene expression and peptide release in intact rats. *Brain Res.* 777, 231-236.
- Wang,Q., Bing,C., Al-Barazanji,K., Mossakowaska,D.E., Wang,X.M., McBay,D.L., Neville,W.A., Tadayon,M., Pickavance,L., Dryden,S., Thomas,M.E., McHale,M.T., Gloyer,I.S., Wilson,S., Buckingham,R., Arch,J.R., Trayhurn,P., and Williams,G. (1997). Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 46, 335-341.
- Warner,A. and Mittag,J. (2012). Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *J. Mol. Endocrinol.* 49, R29-R35.
- Warner,A., Rahman,A., Solsjo,P., Gottschling,K., Davis,B., Vennstrom,B., Arner,A., and Mittag,J. (2013). Inappropriate heat dissipation ignites brown fat thermogenesis in mice with a mutant thyroid hormone receptor alpha1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 110, 16241-16246.
- Whittle,A.J., Carobbio,S., Martins,L., Slawik,M., Hondares,E., Vazquez,M.J., Morgan,D., Csikasz,R.I., Gallego,R., Rodriguez-Cuenca,S., Dale,M., Virtue,S., Villarroya,F., Cannon,B., Rahmouni,K., Lopez,M., and Vidal-Puig,A. (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.
- Wiersinga,W.M. (2014). Paradigm shifts in thyroid hormone replacement therapies for hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 164-174.
- Wikstrom,L., Johansson,C., Salto,C., Barlow,C., Campos,B.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,L.M. (2012). Hypothalamic dysfunction in obesity. *Proc. Nutr. Soc.* *71*, 521-533.
- Wolfgang,M.J., Cha,S.H., Sidhaye,A., Chohnan,S., Cline,G., Shulman,G.I., and Lane,M.D. (2007). Regulation of hypothalamic malonyl-CoA by central glucose and leptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 19285-19290.
- Wolfgang,M.J., Kurama,T., Dai,Y., Suwa,A., Asaumi,M., Matsumoto,S., Cha,S.H., Shimokawa,T., and Lane,M.D. (2006). The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 7282-7287.
- Won,J.C., Jang,P.G., Namkoong,C., Koh,E.H., Kim,S.K., Park,J.Y., Lee,K.U., and Kim,M.S. (2009). Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity. (Silver. Spring)* *17*, 1861-1865.
- Woods,A., Dickerson,K., Heath,R., Hong,S.P., Momcilovic,M., Johnstone,S.R., Carlson,M., and Carling,D. (2005). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* *2*, 21-33.
- Woods,A., Johnstone,S.R., Dickerson,K., Leiper,F.C., Fryer,L.G., Neumann,D., Schlattner,U., Wallimann,T., Carlson,M., and Carling,D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* *13*, 2004-2008.
- Woods,S.C., Schwartz,M.W., Baskin,D.G., and Seeley,R.J. (2000). Food intake and the regulation of body weight. *Annu. Rev. Psychol.* *51*, 255-277.
- Wren,A.M., Small,C.J., Abbott,C.R., Dhillon,W.S., Seal,L.J., Cohen,M.A., Batterham,R.L., Taheri,S., Stanley,S.A., Ghatei,M.A., and Bloom,S.R. (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* *50*, 2540-2547.
- Wu,J., Bostrom,P., Sparks,L.M., Ye,L., Choi,J.H., Giang,A.H., Khandekar,M., Virtanen,K.A., Nuutila,P., Schaart,G., Huang,K., Tu,H., van Marken Lichtenbelt,W.D., Hoeks,J., Enerback,S., Schrauwen,P., and Spiegelman,B.M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* *150*, 366-376.
- Xia,J.Y., Holland,W.L., Kusminski,C.M., Sun,K., Sharma,A.X., Pearson,M.J., Sifuentes,A.J., McDonald,J.G., Gordillo,R., and Scherer,P.E. (2015). Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. *Cell Metab* *22*, 266-278.
- Xie,M., Zhang,D., Dyck,J.R., Li,Y., Zhang,H., Morishima,M., Mann,D.L., Taffet,G.E., Baldini,A., Khoury,D.S., and Schneider,M.D. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 17378-17383.

- 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.
- Xue,B. and Kahn,B.B. (2006). AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J. Physiol* 574, 73-83.
- 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.
- Yang,G., Badeanlou,L., Bielawski,J., Roberts,A.J., Hannun,Y.A., and Samad,F. (2009a). Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 297, E211-E224.
- Yang,L., Scott,K.A., Hyun,J., Tamashiro,K.L., Tray,N., Moran,T.H., and Bi,S. (2009b). Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *J. Neurosci.* 29, 179-190.
- Yaswen,L., Diehl,N., Brennan,M.B., and Hochgeschwender,U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* 5, 1066-1070.
- Yehuda-Shnaidman,E., Kalderon,B., and Bar-Tana,J. (2013). Thyroid Hormone, Thyromimetics, and Metabolic Efficiency. *Endocr. Rev.*
- Yen,C.L., Stone,S.J., Koliwad,S., Harris,C., and Farese,R.V., Jr. (2008). Thematic review series: glycerolipids. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J. Lipid Res.* 49, 2283-2301.
- Yoneshiro,T., Aita,S., Matsushita,M., Kameya,T., Nakada,K., Kawai,Y., and Saito,M. (2011). Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity. (Silver. Spring)* 19, 13-16.
- Yoshimatsu,H., Egawa,M., and Bray,G.A. (1993). Sympathetic nerve activity after discrete hypothalamic injections of L-glutamate. *Brain Res.* 601, 121-128.
- Zhan,C., Zhou,J., Feng,Q., Zhang,J.E., Lin,S., Bao,J., Wu,P., and Luo,M. (2013). Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* 33, 3624-3632.
- Zhang,R., Dhillon,H., Yin,H., Yoshimura,A., Lowell,B.B., Maratos-Flier,E., and Flier,J.S. (2008). Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* 149, 5654-5661.
- Zhang,Y., Kerman,I.A., Laque,A., Nguyen,P., Faouzi,M., Louis,G.W., Jones,J.C., Rhodes,C., and Munzberg,H. (2011). Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J. Neurosci.* 31, 1873-1884.
- 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.
- Zimmermann,R., Lass,A., Haemmerle,G., and Zechner,R. (2009). Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 494-500.

## Bibliografía

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.









