

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**



Inducción de UCP1 en 3 subconjuntos de tejido adiposo marrón mediado por la acción de insulina o interleucina-1 $\beta$  en el área preóptica del hipotálamo en ratones C57BL6

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

**MARÍA ELIZABETH CARRIZALEZ ABUNDIS**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. MANUEL SANCHEZ ALAVEZ**

TIJUANA, B. C., MÉXICO DICIEMBRE DE 2021

## **DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.**

**“Inducción de UCP1 en 3 subconjuntos de tejido adiposo marrón mediado por la acción de insulina o interleucina-1 $\beta$  en el área preóptica del hipotálamo en ratones C57BL6”**

Se permite el uso académico de información contenida en esta tesis, siempre y cuando se otorgue el crédito correspondiente al autor. Para la reproducción parcial o total de este documento con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de las autoridades que avalan esta tesis.

---

**Dra. Susana González Reyes**  
**RESPONSABLE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

---

**Dra. Julieta Yadira Islas Limón**  
**DIRECTORA DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

---

**Dr. Carlos José Martín Vera Hernández**  
**SUB-DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA**

Tijuana, Baja California, a 29 de noviembre del 2021

COMITÉ DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS  
MÉDICAS FACULTAD DE MEDICINA Y  
PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como director de la tesis titulada “Inducción de UCP1 en 3 subconjuntos de tejido adiposo marrón mediado por la acción de insulina o interleucina 1 $\alpha$  en el área preóptica del hipotálamo en ratones C57BL6”, elaborada por María Elizabeth Carrizalez Abundis, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



---

**DR. MANUEL SANCHEZ ALAVEZ**

Director de Tesis

Tijuana, Baja California, a 30 de noviembre del 2021

COMITÉ DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS  
MÉDICAS FACULTAD DE MEDICINA Y  
PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como sinodal de la tesis titulada “Inducción de UCP1 en 3 subconjuntos de tejido adiposo marrón mediado por la acción de insulina o interleucina 1 $\alpha$  en el área preóptica del hipotálamo en ratones C57BL6”, elaborada por María Elizabeth Carrizalez Abundis, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



---

**DRA. SUSANA GONZALEZ REYES**

Sinodal

Tijuana, Baja California, a 30 de noviembre del 2021

COMITÉ DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO MAESTRÍA EN CIENCIAS  
MEDICAS FACULTAD DE MEDICINA Y  
PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como sinodal de la tesis titulada “Inducción de UCP1 en 3 subconjuntos de tejido adiposo marrón mediado por la acción de insulina o interleucina 1 $\alpha$  en el área preóptica del hipotálamo en ratones C57BL6”, elaborada por María Elizabeth Carrizalez Abundis, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



---

**DRA. IDANYA RUBI SERAFIN  
HIGUERA**

Sinodal

## **Dedicatoria.**

Pese a que no siempre estamos de acuerdo, perpetuamente me brindas tu apoyo incondicional, por esta razón, querida hermana, te dedico el esfuerzo, tiempo y desvelos para llegar a la culminación de esta etapa. ¡Compañeras eternas, en las buenas y no tan buenas!

## **Agradecimiento.**

Agradezco a mis mentores, quienes, a lo largo de esta travesía me dieron como obsequios invaluable, su tiempo, conocimiento y experiencia.

Esforzados por ayudarme y motivarme a culminar esta etapa de mi formación, pese a las adversidades.

## Resumen.

Introducción: La regulación de la temperatura corporal central tiene como objetivo el mantenimiento de la temperatura corporal dentro de un rango de variación mínima a pesar de las variaciones del medio ambiente. Se han identificado una serie de circuitos locales inhibitorios y excitatorios en el hipotálamo que convergen en relevos a nivel del rafe pálido rostral y neuronas preganglionares simpáticas y que terminan en órganos blanco que permiten la pérdida o producción de calor y el balance de ambos determina la temperatura corporal central. Recientemente se identificaron receptores para Insulina que al igual que los receptores de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) hiperpolarizan a las neuronas GABAérgicas dando como resultado su inhibición, lo que produce predominio de la actividad glutamatérgica y activación de termogénesis. Los estudios con 2- [18F] fluoro-2-desoxiglucosa (18F-FDG) indican que diferentes subconjuntos de tejido adiposo participan en la termogénesis lo que puede abrir una nueva posibilidad de explicar el porqué de la diferencia de magnitud de la respuesta térmica siendo mayor para IL-1 $\beta$  comparado a insulina, por tal motivo, el objetivo de nuestro estudio es determinar si los mismos subconjuntos de tejido adiposo marrón son inducidos por la activación hipotalámica anterior de los receptores para IL-1 $\beta$  o insulina.

Diseño y métodos de investigación: El efecto de la microinyección de IL-1 $\beta$  y de insulina en el área preóptica del hipotálamo en ratones, se midió por radioteleetría para determinar la temperatura corporal central y su correlación con la inducción del ARN mensajero para UCP1 y sus proteínas reguladoras.

Resultados: La microinyección con IL-1 $\beta$  induce un aumento significativo de la temperatura corporal y de la inducción de ARNm UCP1 comparado al grupo control y el tratado con insulina en el tejido adiposo marrón subescapular y mediastino solamente, sin modificar el ARNm de las proteínas reguladoras. La microinyección con insulina produce una respuesta térmica, pero de menor magnitud a la IL-1 $\beta$ , pero significativamente mayor al grupo control, sin modificar la inducción de ARNm para UCP1 o ARNm de proteínas reguladoras.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran que la IL-1 $\beta$  induce ARNm para UCP1 lo que puede explicar su elevada magnitud de respuesta y que el efecto térmico de insulina no requiere regulación de UCP1.

Palabras clave: Insulina, IL-1 $\beta$ , hipotálamo, POA, hipertermia, tejido adiposo marrón, ARNm UCP1.

## **Abstract.**

Introduction: The regulation of core body temperature aims to maintain body temperature within a range of minimal variation despite extreme variations in the environment. A series of local inhibitory and excitatory circuits have been identified in the hypothalamus that converge in relays at the level of the anterior rostral raphe and sympathetic preganglionic neurons and that end in target organs that allow the loss or production of heat and the balance of both determines the core body temperature. Receptors for insulin were recently identified and that, like interleukin-1 $\beta$  receptors, hyperpolarize GABAergic neurons, resulting in their inhibition, which produces a predominance of glutamatergic activity and activation of thermogenesis. Studies with 2-[18F] fluoro-2-deoxyglucose (18F-FDG) indicate that different sets of adipose tissue participate in thermogenesis, which may open a new possibility to explain the reason for the difference in the magnitude of the thermal response being higher for IL-1 $\beta$  compared to insulin, for this reason, the objective of our study is to determine whether the same sets of brown adipose tissue are induced by anterior hypothalamic activation of IL-1 $\beta$  receptors or insulin.

Research design and methods: The effect of IL-1 $\beta$  and insulin microinjection in the preoptic area of the hypothalamus in mice was measured by radiotelemetry to determine the core body temperature and its correlation with the induction of messenger RNA for UCP1 and its regulatory proteins.

Results: Microinjection with IL-1 $\beta$  induces a significant increase in core body temperature and an induction of UCP1 mRNA compared to the control group and the group treated with insulin in the subscapular and mediastinal adipose tissue without modifying the mRNA of the regulatory proteins. Microinjection with insulin produces a thermal response, but of lesser magnitude to IL-1 $\beta$ , but significantly greater than the control group without modifying the induction of mRNA for UCP1 or mRNA of regulatory proteins.

Conclusions: Our results show that IL-1 $\beta$  induces messenger RNA for UCP1, which may explain its high response magnitude and that the thermal effect of Insulin does not require regulation of UCP1.

Key words: Insulin, IL-1 $\beta$ , hypothalamus, POA, hyperthermia, brown adipose tissue, UCP1 mRNA

## ÍNDICE.

<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....</b>	<b>II</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>VI</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>X</b>
<b>1 ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>2 I INTRODUCCION. ....</b>	<b>2</b>
<b>3 ANECDENTES. ....</b>	<b>3</b>
3.1 HIPOTÁLAMO ANTERIOR Y CONTROL DE TEMPERATURA CENTRAL. ....	3
3.2 REGULACIÓN DE LA TEMPERATURA CENTRAL DURANTE LA INFECCIÓN. ....	6
3.3 TEMPERATURA CENTRAL Y ESTADO ENERGÉTICO. ....	7
3.4 DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DE TEJIDO ADIPOSO MARRÓN.....	10
<b>4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>13</b>
<b>5 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>6 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>16</b>
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	16
<b>7 HIPÓTESIS .....</b>	<b>16</b>
<b>8 MATERIAL Y MÉTODOS. ....</b>	<b>16</b>
8.1 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES.....	17

8.2	MEDICIÓN DE TEMPERATURA CORPORAL CENTRAL POR TELEMETRÍA .....	17
8.3	FÁRMACOS. ....	18
8.4	CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA. ....	18
8.5	MICROINYECCIÓN EN POA. ....	19
8.6	EUTANASIA Y EXTRACCIÓN DE TEJIDO BAT. ....	19
8.7	PCR EN TIEMPO REAL. ....	20
8.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO. ....	20
<b>9</b>	<b>RESULTADOS. ....</b>	<b>21</b>
9.1	EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE IL-1B E INSULINA EN EL ÁREA PREÓPTICA EN LOS GENES PARA UCP1, PGCIA Y PPAR $\gamma$ EN TRES DEPÓSITOS DE TEJIDO ADIPOSO MARRÓN ASOCIADOS CON EL PROGRAMA TERMOGÉNICO. ....	27
<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN. ....</b>	<b>29</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES ....</b>	<b>30</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS. ....</b>	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Regulación hipotalámica de la temperatura central .....	4
Figura 2. Regulación hipotalámica de la activación de tejido adiposo marrón .....	14
Figura 3. Fluctuación circadiana de temperatura corporal central .....	22
Figura 4. Efecto hipertérmico de IL-1b e Insulina inyectados en el área preóptica .....	23
Figura 5. inducción de UCP1 y genes reguladores en BAT interescapular por administración de IL-1β o Insulina .....	24
Figura 6. inducción de UCP1 y genes reguladores en BAT de mediastino por administración de IL-1β o Insulina .....	25
Figura 7. inducción de UCP1 y genes reguladores en BAT axilar por administración de IL-1β o Insulina .....	26

## 1 ABREVIATURAS.

BAT	Tejido adiposo marrón
iBAT	Tejido adiposo marrón interescapular
mBAT	Tejido adiposo marrón mediastínico
aBAT	Tejido adiposo marrón axilar
WAT	Tejido adiposo Blanco
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
UCP1	Proteína desacoplante 1
POA	Área preóptica
LPB	Núcleo parabraquial lateral
MnPO	Subnúcleo preóptico medio
MPA	Área preóptica medial
DMH	Hipotálamo dorso medial
DH	Área hipotalámica dorsal
RRPa	Rafe pallidus rostral
IML	Núcleo intermedio lateral
aCSF	Líquido cefalorraquídeo artificial
PPAR $\gamma$	Activador de la proliferación de peroxisomas $\gamma$
SNS	Sistema nervioso simpático

## 2 I INTRODUCCION.

En animales homeotermos la temperatura corporal central, definida como la temperatura de los órganos internos, tejidos profundos y cerebro, se mantiene dinámicamente regulada en un nivel de ajuste constante, donde existe un rango mínimo de variación térmica que son necesarios para optimizar las funciones celulares a pesar de que el entorno ambiental térmico sea adverso y extremadamente variable (Madden & Morrison, 2019). Para que este mantenimiento homeostático ocurra, es necesario la existencia de un centro modulador dentro del sistema nervioso central que actúa como un “termostato biológico” y que ajusta los requerimientos térmicos a un nivel fisiológico normal a través de la activación de vías neuronales específicas encaminadas a controlar la actividad autonómica para perder o ganar calor, así como llevar a cabo cambios conductuales encaminados a adoptar posturas corporales para aumentar o disminuir superficie corporal y conservar o disipar temperatura. Dentro de las respuestas autonómicas para producir o mantener calor podemos encontrar termogénesis en el tejido adiposo marrón, hipoventilación, vasoconstricción y activación de actividad muscular (titiriteo), y dentro de las respuestas autonómicas que ayudan a perder calor se encuentran vasodilatación, sudoración e hiperventilación, así como inhibición de termogénesis y actividad muscular (McAllen et al., 2010; Tan & Knight, 2018). En cuanto a las respuestas conductuales encontramos que los organismos pierden calor al adoptar cambios posturales para aumentar exposición de superficie corporal, búsqueda de ambientes fríos o aumentar ventilación de madrigueras, mientras que para conservar calor los organismos disminuyen exposición de superficie corporal, buscan ambientes más calientes o se acurrucan en madrigueras o socialmente (Tan & Knight, 2018). La caracterización de neuronas GABAérgicas en el área preóptica fue determinante para explicar la función del termostato hipotalámico y los efectos de IL-1 $\beta$  en las neuronas sensibles a calor (Davis et al., 2006; Sanchez-Alavez et al., 2006) y posteriormente los estudios con 18F-FDG comprobaron también que los receptores a insulina en las neuronas sensibles a calor participan en la termogénesis (Sanchez-Alavez et al., 2010), pero que diferentes unidades de tejido adiposo marrón son activados por insulina

comparado a los activador por IL-1 $\beta$  lo que puede abrir una nueva posibilidad de explicar por qué la diferencia de magnitud de la respuesta térmica es mayor para IL-1 $\beta$  comparado a insulina, por tal motivo, el objetivo de nuestro estudio es determinar si los mismos conjuntos de tejido adiposo marrón son inducidos por la activación hipotalámica anterior de los receptores a IL-1 $\beta$  o receptores a insulina a través de la medición de ARNm para la UCP1 mitocondrial.

### 3 ANECDENTES.

#### 3.1 Hipotálamo anterior y control de temperatura central.

El ajuste de la temperatura corporal central está controlado por un grupo de neuronas llamadas *neuronas sensibles a calor* localizadas en forma esparcida en varias áreas del hipotálamo anterior que incluyen el área preóptica (POA), área preóptica mediana (MnPO) y área preóptica medial (mPO) (da Conceição et al., 2020; Madden & Morrison, 2019). Estas neuronas, que en su mayoría son GABAérgicas forman circuitos locales y circuitos de proyección fuera del hipotálamo anterior, ejerciendo un control inhibitorio local y un control inhibitorio a distancia. Estas neuronas GABAérgicas coexisten con un pequeño grupo de neuronas glutamatérgicas que provienen del área preóptica mediana, quienes a diferencia de la neuronas GABAérgicas, ejercen un control excitatorio (da Conceição et al., 2020) organizándose también en circuitos locales y circuitos de proyección que modulan relevos neuronales localizados en el hipotálamo dorsal medial e hipotálamo dorsal (DMH/DA) y de ahí continúan con relevos en el rafe dorsal para llegar a relevos neurales finales que controlan la actividad autonómica efectora de los órganos blanco. Las respuestas en los órganos blanco modulan cambios vasculares cutáneos (vasoconstricción o vasodilatación activa), termogénesis (actividad muscular y acción termogénica de tejido adiposo marrón) y perdida de calor por evaporación (sudoración en humanos, salivación en roedores) (Cao et al., 2013; Madden & Morrison, 2019; Morrison, 2016).

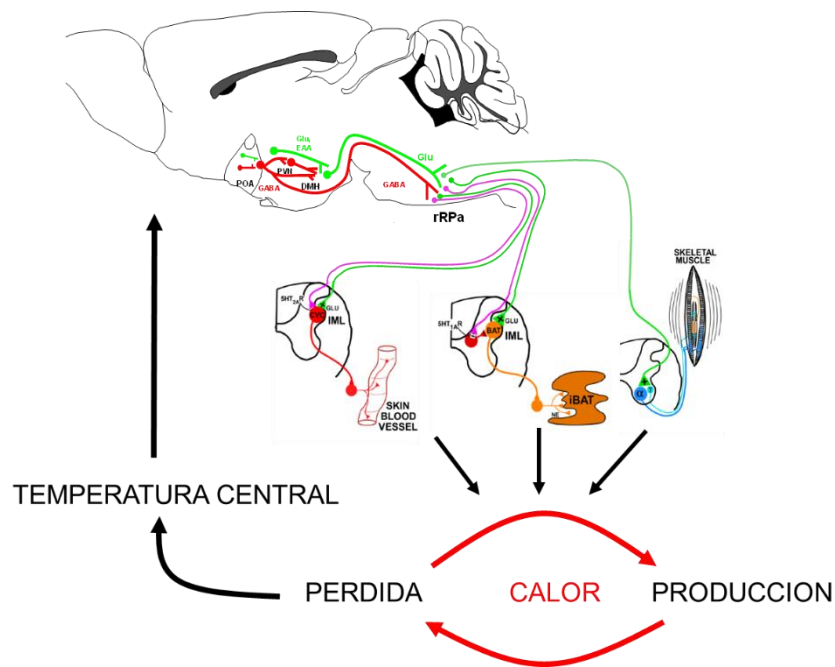


Figura 1. Regulación hipotalámica de la temperatura central. El sistema GABAérgico del área preóptica (rojo) inhibe la actividad de las neuronas glutamatérgicas excitatorias (verde) del hipotálamo dorsal medial e hipotálamo dorsal (DMH/DA) dando como resultado inhibición de termogénesis. Una reducción de la actividad GABAérgica estimula termogénesis. El balance entre producción y pérdida de calor determinara la temperatura central. Modificado del modelo de Tupone y cols (2014). Rafe pálido rostral (rRPa), área parapiroamidal (PaPy), neuronas preganglionares simpáticas (SPN), núcleo espinal intermediolateral (IML), tejido adiposo marrón (BAT).

En 1961 Nakayama y colaboradores realizaron los primeros registros de la actividad eléctrica de neuronas termosensibles en el POA *in vivo* y encontraron que las neuronas descargan tónicamente a temperaturas termoneutrales (rango de temperatura ambiental 28-32 °C donde la disipación y conservación de calor en el cuerpo es mínima) (Pallubinsky et al., 2019). Durante el calentamiento hipotalámico local las neuronas aumentan sus descargas, y este evento coincide con la disminución en la termogénesis (Nakayama et al. 1961). Posteriormente se encontró que el enfriamiento de la piel reduce la descarga tónica de estas neuronas lo que coincide con un aumento de la termogénesis

(Boulant & Hardy, 1974). Subsiguiente se confirmó con base a las características electrofisiológicas, que estas neuronas son células GABAérgicas que responden a los cambios de temperatura corporal central, aumentando su frecuencia de potenciales de acción con el aumento de la temperatura hipotalámica local y en consecuencia inhiben la producción de calor (Boulant, 1998; Nakamura & Morrison, 2007) estableciéndose un rol determinante en la conexión de temperatura hipotalámica anterior y el ajuste a través del cambio de las características biofísicas de estas neuronas GABAérgicas dentro del “termostato biológico”.

Estudios más detallados han encontrado que las proyecciones de neuronas GABAérgicas en el área preóptica inhiben la actividad de las neuronas glutamatérgicas excitatorias del hipotálamo dorsal medial e hipotálamo dorsal (DMH/DA) dando como resultado inhibición de termogénesis (C. L. Tan et al., 2017; da Conceição et al., 2021; Mota et al., 2020). Por tanto, el balance entre la actividad GABAérgica y la actividad glutamatérgica va a establecer una regulación tónica donde podemos ver como resultado: a) un predominio GABAérgico sobre la actividad glutamatérgica resultando en inhibición autonómica y disminución de termogénesis, b) un déficit GABAérgico sobre la actividad glutamatérgica resultando en estimulación autonómica y aumento de termogénesis (Tupone et al., 2014). El balance estimulador o inhibitorio se proyecta a neuronas premotoras que se localizan en el rafe pálido rostral (rRPa), el área parapiramidal (PaPy) y la medula ventromedial rostral donde estas neuronas premotoras proyectan a las neuronas preganglionares simpáticas (SPN) en el núcleo espinal intermediolateral (IML). De este grupo de neuronas premotoras se han caracterizado neuronas que liberan glutamato y excitan a las SPN mientras que otro grupo de neuronas premotoras liberan serotonina (5-HT<sub>1A</sub>) e inhiben interneuronas en el IML para favorecer el flujo simpático a tejido adiposo marrón (Madden & Morrison, 2019; Mohammed et al., 2018; Tupone et al., 2014). Numerosos estudios demuestran que el descenso de la temperatura ambiental es el estimulador principal de la organización hipotalámica para la activación del tejido adiposo marrón (Jespersen et al., 2013; Petrovic et al., 2010), dicho evento se da por primera vez al momento del nacimiento, ante la diferencia de temperatura intrauterina y extrauterina (Lubkowska et al., 2020).

La activación del BAT inducida por el frío consume entre 25-400 kcal/día (Cypess et al., 2014). Pero no es el único impacto positivo, ya que también mejora el metabolismo de la insulina y la leptina gracias a la capacidad que tienen los adipocitos termogénicos de captar glucosa y lípidos de la circulación (Guerra et al., 2001; Bartelt et al., 2011). Se ha señalado que ante la alta demanda de energía y frente a la termogénesis inducida por la exposición al frío o la dieta, el NPY en el DMH aumenta la termogénesis causando un tono inhibitorio basal sobre el DMH (Cao et al., 2001; Cao et al., 2004; Cao & Morrison 2006; Dimicco & Zaretsky 2007).

### **3.2 Regulación de la temperatura central durante la infección.**

Dentro de la fase de respuesta aguda a la infección, las citocinas juegan un papel muy importante en el desarrollo de la fiebre por inhibición de la actividad GABAérgica y liberación de su efecto inhibitorio sobre el papel de las neuronas glutamatérgicas dentro del circuito autonómico controlado por el área preóptica. La IL-1 $\beta$ , el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y la interleucina 6 (IL-6), son las citocinas proinflamatorias que tienen un efecto inductor de termogénesis por su actividad en el área preóptica (Engström y cols, 2012). El lipopolisacárido (LPS) que deriva de la membrana de las bacterias gramnegativas activa al receptor-Toll 4 (TLR4) que actúa como un componente de la membrana celular esencial para traducción de señales e inducción de la producción de citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL6 y TNF-alfa) (Sandeep, 2013). Se ha propuesto que la IL-1 $\beta$  juega un rol importante en el inicio de la producción de fiebre al activar en el área preóptica a receptores de interleucina 1 (IL-1R1) (Madden & Morrison, 2019). Entre las vías de señalización dentro del área preóptica se encuentran la vía dependiente de la activación de una vía rápida que depende de la dimerización de MyD88, el cual activa a la N-espingomielinasa que posteriormente cataliza la formación de ceramida y produce el bloqueo de canales de NMDA y/o activación de canales de K<sup>+</sup> con la consecuente hiperpolarización y disminución de la frecuencia de disparo durante los primeros 30 minutos (respuesta rápida) (Sanchez-Alavez et al., 2006; Bartfai et al., 2007). La segunda vía de señalización intracelular depende del acoplador MyD88 misma que fosforila IRAK-4 y luego IRAK-1 seguido de activación de TRAF6 y así como los factores de

transcripción NF- $\kappa$ B que activa la expresión de genes para las citoquinas COX2, ON y PLA2. La COX2 va a actuar en el ácido araquidónico para la síntesis de prostaglandina E2 a partir de la acción de la prostaglandina E sintasa (PgES), que es una enzima de 16-17K, que actúa sobre la prostaglandina endoperoxido H2 (PGH2). Se han identificado varias prostaglandinas E sintasas, entre ellas la prostaglandina E sintasa microsomal 1 (mPgES-1), mPgES-2 y la PgES citosólica (cPgES) y son necesarias para la formación de PGE2. Se ha demostrado que cuando se inyecta IL-1 de forma sistémica, se inicia un aumento en la cantidad de ARNm de la PgES en los vasos sanguíneos cerebrales después de una hora, con un pico máximo de tres horas, y con retorno a las concentraciones basales a las cinco horas después de la inyección. Al mismo tiempo, se ha demostrado que estas mismas células vasculares presentan también un aumento en la inducción del ARNm para la síntesis de la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2), misma que participa en la vía de producción de la PGE2. Por lo tanto, la cinética de inducción, tanto de PgES como de COX-2, se relaciona con la producción de PGE2, a partir del ácido araquidónico en los vasos sanguíneos cerebrales después de la activación inmune (Simm et al., 2016; Endo et al., 2014).

La PGE2 se une al receptor EP3 en las neuronas GABAérgicas sensibles a temperatura y las inhibe. En conclusión, la fiebre es una respuesta integral en cadena que inicia en el sistema circulatorio con LPS y liberación de citosinas que activan la producción de PGE2 en el área preóptica, misma que inhibe a las neuronas GABAérgicas de proyección, las cuales posteriormente van a liberar la actividad simpática excitatoria de las neuronas del rafe pálido y área parapiramidal, estimulando la cadena preganglionar simpática de los núcleos intermediolaterales de la médula espinal que proyectan al tejido adiposo marrón para activar la termogénesis.

### **3.3 Temperatura central y estado energético.**

El equilibrio entre la producción y pérdida de calor determina el nivel de temperatura corporal central, y es en forma directa un indicador del nivel de la homeostasis energética, siendo regulados centralmente por distintos núcleos del

hipotálamo anterior. La homeostasis de los nutrientes está regulada por diferentes regiones hipotalámicas que incluyen el núcleo paraventricular y el núcleo arcuato, que contienen neuronas que responden a cambios en el nivel de glucosa, lípidos, grelina, leptina e insulina (Leibowitz & Wortley, 2004; Plum et al., 2005). La caracterización de transcritos de DNAc por microarreglos indica que en las neuronas sensibles a calor del hipotálamo anterior mostraron la presencia de ARNm del receptor de insulina, adiponectina e IGF-1 (Eberwine & Bartfai, 2011), por lo que se evaluaron sus efectos en la respuesta electrofisiológica en rebanadas de cerebro de ratón, así como la evaluación conductual *in vivo* en la inducción de respuesta térmica (Sanchez-Alavez et al., 2010, 2011; Klein et al., 2011). La inyección de insulina en el área preóptica del hipotálamo indujo una elevación de la temperatura corporal central mediada por la estimulación de la termogénesis de BAT, así como una disminución de la tasa de intercambio respiratorio (Sanchez-Alavez et al., 2010). Estos datos muestran cómo la insulina puede actuar a modo de estimulador central en el hipotálamo para activar la oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo marrón. El trazado retrógrado indica que las neuronas sensibles al calor WSN por sus siglas en inglés (warm sensitive neuron) que expresan el receptor de insulina activan BAT a través de la proyección de relevos en rafe pálido rostral. Sin embargo, no todas las WSN probadas respondieron a la insulina y ninguna respondió a la leptina o cambios en las concentraciones de glucosa lo que indica que las WSN constituyen una población heterogénea de neuronas y que la insulina inhibe solo un subconjunto de estas neuronas del POA; no obstante, este subconjunto representa una entrada lo suficientemente potente en la regulación BAT, como para causar una respuesta hipertérmica. Este mismo principio lo observamos con IGF-1 y adiponectina. Las WSN sensibles a la insulina pueden mediar acciones importantes para el equilibrio energético y participar en los efectos térmicos de los alimentos, siendo necesario recalcar que este efecto está inversamente correlacionado con el grado de resistencia a la insulina, la grasa corporal y propuesto en el desarrollo de la obesidad (de Jonge & Bray, 1997).

Se ha establecido que la señalización de la insulina y el IGF-1 mediante sus receptores IR y IGF1R localizados en el área preóptica, son importantes para la

respuesta hipertérmica no pirogénica (Kleinridders et al., 2014; Sanchez-Alavez et al., 2011; Soto et al., 2019). El receptor de insulina (IR) y el de IGF1 (IGF1R) están formados por dos subunidades  $\alpha$  y dos subunidades  $\beta$ . Dichas subunidades están conectadas por puentes disulfuros, dando lugar a un heterotetrámero  $\alpha_2\beta_2$ . Presentan una alta similitud en ambas subunidades, siendo de 45-65% en las  $\alpha$  (unión a ligando) y del 60-85% en los dominios con actividad tirosina quinasa (Belfiore et al., 2009). Aun siendo tan similares, presentan particularidades con relación a la especificidad de unión a los ligandos, distribución tisular y en sus funciones biológicas. La regulación del metabolismo energético está a cargo del IR, en tanto que IGF1R interviene en el crecimiento y el desarrollo (Kim & Accili, 2002; Kleinridders et al., 2014).

El tejido adiposo en general está conformado por tejido conectivo laxo, gran cantidad de adipocitos, preadipocitos, células madre mesenquimatosas, células inmunitarias, endoteliales y musculo liso, que se encuentran rodeados por amplias redes de capilares e inervación nerviosa (Cinti, 2012; Frühbeck, 2008). Los adipocitos maduros solo constituyen entre 20 y 40% del contenido celular de un depósito graso (Rosen, E. D., & Spiegelman, 2014; Song & Kuang, 2019). Los adipocitos presentan variantes estructurales, así, el adipocito marrón es una variante celular que presenta múltiples vacuolas lipídicas, lo que le confiere una estructura multilocular con un núcleo central y gran número de mitocondrias grandes, redondas, con crestas bien desarrolladas y la proteína desacoplante 1 (UCP1) en su membrana, las cuales son las responsables del color marrón que da nombre a este tejido (Frontini & Cinti 2010). A diferencia, el adipocito blanco (WAT) es unilocular, con un núcleo en posición periférica, bajo número de mitocondrias pequeñas, elongadas y con una disposición de las crestas aleatoria (Corina-Sosa et al., 2020). La termogénesis en tejido adiposo marrón está mediada principalmente por la UCP1 que se encuentra en la membrana mitocondrial interna de los adipocitos, y se utiliza como marcador molecular para reconocer estos adipocitos (Keipert et al., 2015).

### **3.4 Distribución anatómica de tejido adiposo marrón.**

El BAT presenta diferencia de localización entre ratón y humanos. En ratones, los subconjuntos presentes son: mediastínico (mBAT), axilar (aBAT), perirrenal (prBAT), cervical (cBAT) e interescapular (iBAT), siendo este último el de mayor tamaño (de Jong et al., 2015; Jung et al., 2019). El iBAT está presente en humanos neonatos y niños, pero no en adultos ya que suele ir desapareciendo con el desarrollo. En adultos los subconjuntos de BAT se localizan a lo largo de médula espinal, en región axilar, abdominal y supraclavicular (más abundante), además en cuello, mediastino y zona suprarrenal, que son equivalentes con el cBAT, mBAT y prBAT del ratón (de Jong et al., 2015; Madden & Morrison, 2019).

Los adipocitos beige son otro tipo celular que surge en el tejido adiposo blanco (WAT) ante la exposición al frío prolongada o la estimulación adrenérgica (Algire et al., 2013; Kajimura et al., 2015; Symonds et al., 2018). Su cantidad es variable de un depósito de WAT a otro, teniendo mayor presencia en los conjuntos inguinal y retroperitoneal.

Con relación a WAT, también existen diferencias entre ratón y humano. En ratón se localiza en dos compartimentos subcutáneos: el anterior que comprende los subconjuntos dorsal e interescapular, y el posterior formado por los subconjuntos inguinal, dorsolumbar y glúteo. Mientras que el compartimento visceral este se subdivide en conjunto: retroperitoneal, mesentérico y perigonadal (de Jong et al., 2015). En tanto que, en humanos, el compartimento subcutáneo forma una capa continua a lo largo del cuerpo exceptuando manos y pies (Giordano et al., 2014; Lapid & Graff, 2017; Miletta & Horvath, 2018).

El tejido adiposo marrón es pilar termogénico gracias a que posee características tales como: fácil recepción de sustrato metabólico y distribución fluida del calor, mediante su amplia red vascular; asimismo el tejido adiposo marrón tiene elevada inervación del sistema nervioso simpático (SNS) (Spiegelman & Flier, 2001; Tupone et al., 2014); y en su membrana mitocondrial interna expresa la UCP1 (Chouchani et al., 2019; Kalinovich et al., 2017). Como respuesta al frío los nervios simpáticos liberan noradrenalina (NA).

La NA se une a los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos presentes en la membrana celular del adipocito marrón, permitiendo que la adenilciclase convierta el adenosín trifosfato (ATP) en adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Por un lado, el AMPC promueve la formación de tridotironina (T3) en los adipocitos marrones (Lynes & Tseng, 2018). Y por otro, fosforila la proteína quinasa A (PKA) que fosforila la Perilipina 1 para que se liberen almacenes lipídicos, y la lipasa sensible a hormonas (HSL) para unirse a las vacuolas lipídicas al desprenderse Perilina 1, permitiendo la lipólisis de los triglicéridos a ácidos grasos libres y glicerol (Rajan et al., 2014).

Los ácidos grasos libres convertidos a acetil-Coenzima A (acetil-CoA) se transforman en acetil-carnitina por acción de la acetil-CoA, para ser transportados a través de la isoforma M de la carnitil palmitoil transferasa 1 (CP- TI-M). Siendo este el punto limitante de la  $\beta$  oxidación, ya que CPTI-M puede ser inhibida por el malonil-CoA (sustrato involucrado en la lipogénesis de novo), por tanto, en un estado de lipogénesis se impide la oxidación de los ácidos grasos (Rutkowski JM et al., 2015). Enseguida, la carnitil palmitoil transferasa 2 (CPTII) transporta a la acetil-carnitina permitiendo la liberación del acetil-CoA de la carnitina. La  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos y la actividad del ciclo del Krebs permiten la formación de intermediarios reducidos como el flavín adenín dinucleótido (FADH) y el nicotín adenín dinucleótido (NADH), mismos que se oxidan para ceder sus electrones a la cadena de transporte de electrones. Esto permitirá la conducción de los protones primero al espacio intermembranal mitocondrial formando un gradiente que es usado para impulsar esos protones de regreso al interior de la matriz mitocondrial a través de la proteína UCP1, transformando así esta energía en calor (Cannon & Nedergaard, 2004).

La NA induce la fosforilación y activación de p38 MAPK, el cual fosforila al factor activador de la transcripción 2 (Atf-2), para que se desplace al núcleo y promueva la transcripción del proliferador de peroxisomas inducido por cAMP 1 $\alpha$  (Pgc1- $\alpha$ ) (Seale & cols., 2008). Por su parte, Pgc1- $\alpha$  es fosforilado y activado con el consiguiente aumento de la transcripción de genes termogénicos, como Ucp1 (Villarroya & Vidal-Puig, 2013). Asimismo, la expresión de UCP1 está regulada indirectamente a través de la expresión

de PGC1 $\alpha$  misma que coactiva junto con el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ) al potenciador de UCP1 (Ciao et al., 2004).

Por tanto, la liberación de norepinefrina (NE) activa receptores B3-adrenérgicos en el tejido adiposo marrón para inducir termogénesis y en el tejido adiposo blanco para desdoblar los triglicéridos. NE estimula la beta oxidación en la mitocondria inducido por AMPc y proteína quinasa A para formar Acil-CoA. El ciclo de ácido cítrico incorpora moléculas NADH y FADH para ser usado por el sistema de transporte de electrones en la mitocondria y que acoplada con UCP1 produce liberación de energía (Ikeda & Yamada, 2020).

La función más conocida del WAT es como el reservorio primario de energía del organismo, debido a su capacidad para acumular ácidos grasos ante un exceso de nutrientes. Sus enzimas lipogénicas permiten la síntesis de triglicéridos para ser almacenados en la vacuola lipídica. En contraste, durante el ayuno se accionan hormonas lipolíticas como HSL o ATGL, dando lugar a la lipólisis de los triglicéridos. De esta manera los ácidos grasos liberados viajan por el torrente sanguíneo para ser utilizados por distintos tejidos, entre ellos hígado, músculo esquelético y cardíaco (Tang & Lane, 2012). Otras de sus funciones importantes son: la mecánica, protegiendo los órganos internos; la regulación del metabolismo glucídico, expresan el transportador de glucosa GLUT4 y la endocrina, al liberar adipoquinas que actúan a nivel sistémico (Jung et al., 2019).

Entre las adipoquinas más conocidas de WAT, se encuentran leptina, adiponectina, resistina, TNF- $\alpha$  e IL-6; las cuales contribuyen a regular el metabolismo energético y nutricional (Gutiérrez-Ruiz et al., 2011; Lee et al., 2014). Otras adipoquinas que han ido adquiriendo una mayor importancia son: la proteína de unión a retinol 4 (RBP4), que transporta la vitamina A en el suero; el factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), que presenta efectos beneficiosos en la pérdida de peso (Rosen, E. D., & Spiegelman, 2014); y la proteína de adipocitos 2 (aP2), que permite la unión y transporte de ácidos grasos a través del citosol. Se han descrito niveles elevados de aP2 en obesidad y se

considera, promueve la resistencia a la insulina y la gluconeogénesis hepáticas (Cao et al., 2013).

#### 4 Planteamiento del problema.

En estudios separados, durante la evaluación de los efectos térmicos de IL-1 $\beta$  (1.5 ng/0.5  $\mu$ L), insulina (0.03 IU/0.5  $\mu$ L), o IGF-1 (10 ng/0.5  $\mu$ L) en hipotálamo anterior encontramos que hay un efecto diferencial en la magnitud y duración del efecto térmico siendo de 8-12h para IL-1 $\beta$  ( $38.4 \pm 0.22$  °C) (Eberwine y Bartfai, 2011), 6-8h para insulina ( $37.11 \pm 0.04$  °C) (Sanchez Alavez y cols, 2010) o 5-7h para IGF-1 ( $37.5 \pm 0.43$  °C) (Sanchez-Alavez y cols, 2011). El control térmico de referencia es el agonista sintético CP-722221 (Pfizer, USA) que es específico para el receptor adrenérgico  $\beta_3$  que induce efecto térmico directo por estimulación de tejido adiposo pardo durante 2 a 4h ( $37.2 \pm 0.18$  °C) (Spaethling y cols, 2016). Durante estos estudios se evaluaron la captación de 18F-FDG en el tejido adiposo marrón localizado en la región subescapular, observando por primera vez a nivel experimental que la captación también tiene un gradiente diferencial y selectivo en tejido adiposo marrón y que en realidad el tejido adiposo subescapular está formado por cuatro subunidades, dos de ellas mediales/superficiales y otras dos ventrales/laterales y que la microinyección de IL-1 $\beta$  en el área preóptica activa las unidades mediales/superficiales (datos no publicados), en tanto que la microinyección de insulina o IGF-1 en el área preóptica activa las unidades ventrales/laterales (Sanchez-Alavez et al., 2010, 2011).

La medición del consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono y el cálculo de la tasa de eficiencia respiratoria (RER) por calorimetría indirecta indican que en efecto la inyección de IL-1 $\beta$ , insulina o IGF-1 en el área preóptica es seguida por un mayor consumo de oxígeno y una RER más baja en comparación con los ratones tratados con el respectivo vehículo, lo que indica un cambio del metabolismo de la glucosa ante la utilización elevada de ácidos grasos (Sanchez-Alavez et al., 2010, 2011) (Eberwine & Bartfai, 2011; Spaethling et al., 2016).

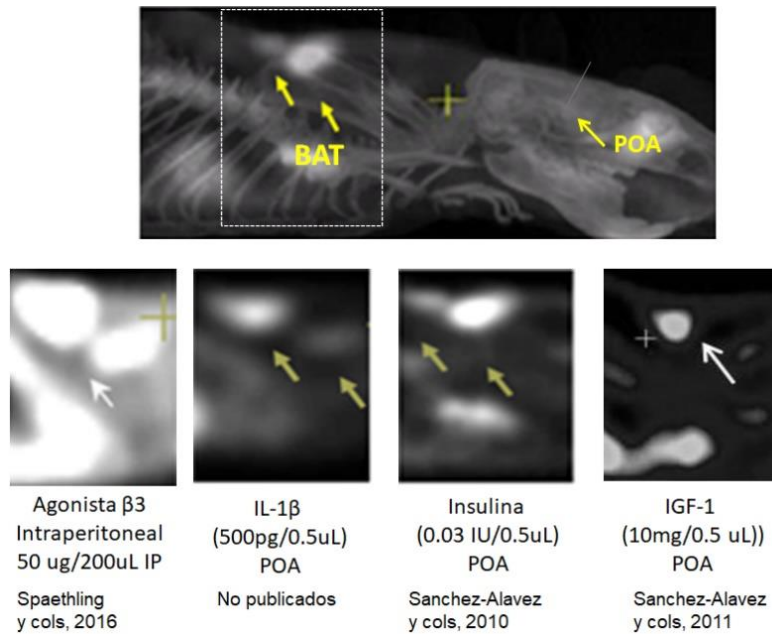


Figura 2. Regulación hipotalámica de la activación de tejido adiposo marrón. Visualización del área preóptica (POA) y tejido adiposo marrón interescapular (iBAT). La administración del agonista  $\beta$ 3 sintético intraperitoneal activa selectivamente el tejido adiposo marrón. Administración de IL-1 $\beta$  en el área preóptica activa las unidades mediales/superficiales en tanto que la microinyección de insulina o IGF-1 en el área preóptica activa las unidades ventrales/laterales.

La termogénesis del tejido adiposo marrón depende principalmente de la activación de la UCP1, que desacopla la fosforilación oxidativa en las mitocondrias para disipar el gradiente electroquímico en forma de calor. Nuestras observaciones indican que la insulina y la IL-1 $\beta$  inducen captación de 18F-FDG en diferentes conjuntos de BAT lo que podría explicar la diferencia en la amplitud y la duración de la inducción de temperatura central (Sánchez-Alavez et al., 2006; Sánchez-Alavez et al., 2009). Proponemos que existen diferentes proyecciones funcionales en el área preóptica, que pueden explicar la activación de diferentes subconjuntos de BAT apoyando la idea de que existe vías pirógenas a cargo del sistema inflamatorio y vías metabólicas a cargo de la insulina.

## 5 JUSTIFICACIÓN.

En el POA existen neuronas GABAérgicas sensibles a calor (warm sensitive neuron) con función inhibitoria sobre los circuitos glutamatérgicos que inducen termogénesis. Las neuronas GABAérgicas del POA expresan receptores a IL-1 $\beta$  y/o receptores a insulina pero que su respectiva activación se relaciona con un efecto térmico diferente tanto en duración como en magnitud. Nuestro proyecto consiste en comparar el efecto térmico que hay entre la administración de un pirógeno endógeno representado por la IL-1 $\beta$  y un regulador metabólico representado por la insulina en una región en común que es el área preóptica. Resultados publicados indican que ambos, la IL-1 $\beta$  y la insulina producen hiperpolarización de las neuronas GABAérgicas y que el resultado final es un déficit GABAérgico sobre la actividad glutamatérgica causando una estimulación autonómica y aumento de termogénesis (Sanchez-Alavez et al., 2006; Sanchez-Alavez et al., 2010; Eberwine & Bartfai, 2011; Tupone et al., 2014). Con base a los resultados de la tasa de eficiencia respiratoria ambos favorecen el metabolismo de lípidos pero la pregunta que apoya este proyecto es saber si la activación de receptores en el área preóptica a IL-1 $\beta$  o insulina inhibe neuronas GABAérgicas que sean parte de circuitos independientes lo que pueda explicar la activación de subconjuntos de BAT diferentes y si es así este proyecto abriría la puerta para proponer vías específicas pirogénicas y vías específicas metabólicas que regulan diferentes poblaciones de BAT a partir del área preóptica. Al notar la activación diferencial de iBAT nos preguntamos, si existe una activación selectiva. Por lo que, el analizar la respuesta de depósitos de aBAT, mBAT y iBAT nos permitirá conocer más de su fisiología en torno a la termorregulación. Contribuyendo a la comprensión de los mecanismos implicados en la eficiencia de la utilización de energía durante la infección (IL-1 $\beta$ ) o estado metabólico (insulina).

## **6 Objetivo general.**

Determinar el efecto termogénico inducido por la microinyección de IL-1 $\beta$  o insulina en el área preóptica del hipotálamo anterior y evaluar la participación de tres conjuntos del BAT a través de la evaluación de la inducción de mRNA de UCP1 en los conjuntos de tejido adiposo marrón axilar (aBAT), mediastínico (mBAT) y el subescapular (iBAT).

### **6.1 Objetivos específicos.**

- Analizar la expresión de ARNm de UCP1 en los conjuntos interescapular, mediastínico y axilar de BAT en ratones C57BL6 inyectados con insulina en el área preóptica.

- Analizar la expresión de ARNm de UCP1 en los conjuntos interescapular, mediastínico y axilar de BAT en ratones C57BL6 inyectados con IL-1 $\beta$  en el área preóptica.

- Cuantificar la temperatura corporal central de ratones C57BL6, antes durante y después de la inyección de insulina o IL-1 $\beta$  en el área preóptica.

## **7 HIPÓTESIS**

La microinyección de Insulina en el área preóptica del hipotálamo activa depósitos de tejido adiposo marrón diferentes a los activados por IL-1 $\beta$ .

## **8 MATERIAL Y MÉTODOS.**

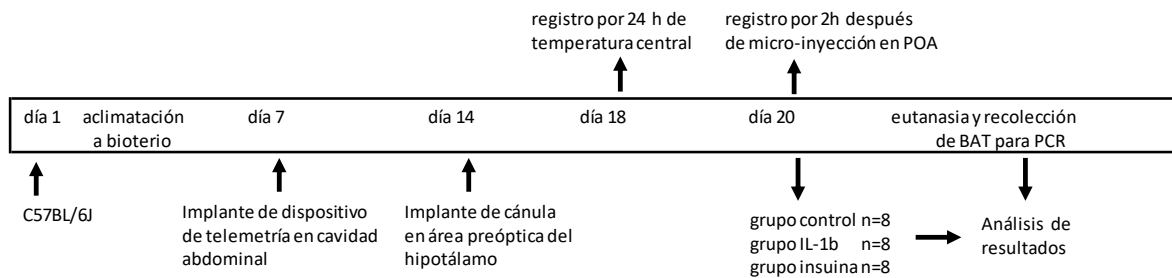
Animales de experimentación. Todos los procedimientos se realizaron en ratones macho C57BL/6J (20-25 g de peso y 3 meses de edad), y su uso fue aprobado por el Comité Institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad Autónoma de Baja California y por el comité para el cuidado y uso de animales de laboratorio de Instituto de

Investigación Scripps en La Jolla California. Los animales se mantuvieron con comida regular (Harlan Teklad LM-485 Diet 7012; carbohidratos 65% kcal, grasas 13%, energía metabolizable 3,41 kcal/g). El acceso a alimentos y agua fue ad libitum (libre demanda), y el ciclo de luz:oscuridad fue 12:12 h con luces encendidas a las 7:00 a.m. a una temperatura ambiental de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 8.1 Protocolos experimentales.

Los ratones se dividieron en 3 grupos de estudio: grupo control tratado con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF), grupo tratado con insulina (INS) y grupo tratado con IL-1 $\beta$  (IL1).

El plan de uso de animales fue acorde al siguiente plan de tiempo:



### 8.2 Medición de temperatura corporal central por telemetría

A los 7 días después que los ratones llegaron al bioterio se realizó la primera cirugía de implante del dispositivo de telemetría. Los ratones fueron anestesiados con isoflorano (inducción 3-5%, mantenimiento 1-1,5%) y se implantaron quirúrgicamente con un dispositivo de radiotelemetría (TA-F20; Data Sciences, St Pau, MN) en la cavidad peritoneal. Se utilizó una técnica antiséptica y se realizó incisión de piel y pared anterior de peritoneo y se expuso la cavidad peritoneal para depositar el implante. Se cerró la cavidad peritoneal con sutura absorbible (Ethicon Plain Gut, 5-0, Fast Absorbing) seguida

de sutura de piel con nylon (Sutralon Nylon Micro Suture). Buprenorfina a 1.5 mg/kg fue administrada por vía intramuscular para manejo de dolor durante y después de la cirugía. Se permitió que los ratones se recuperaran durante 7 días. Los ratones se mantuvieron en cajas individuales de plexiglás dentro del bioterio a temperatura ambiental de  $25 \pm 0.5$  °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (luces encendidas a las 7:00 a.m.) con acceso ad libitum a alimentos y agua.

Las jaulas se colocaron sobre placas receptoras (RPC-1; Data Sciences, St Paul MN) y las señales de radiotelemetría de los implantes se monitorearon continuamente. La temperatura corporal central y la actividad locomotora (número de movimientos horizontales) fueron continuamente monitoreados con un sistema de adquisición de datos completamente automatizado (Dataquest ART Data Sciences, St Pau, MN). Se realizaron registros durante 72h antes del tratamiento para asegurarse de que los niveles de temperatura de referencia fueran estables con ritmo circadiano de 24h.

### **8.3 Fármacos.**

La insulina (I1507; Sigma, St. Louis, MO) se disolvió previamente en solución salina y posteriormente diluido en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, 60 IU/ml). Interleukin-1 $\beta$  human (H6291-10UG, Sigma-Aldrich) se disolvió en solución salina y posteriormente en aCSF a un volumen de 1  $\mu$ g/ml.

### **8.4 Cirugía estereotáxica.**

Una semana después del implante de la interfase de telemetría (día 14) los ratones fueron sometidos a una cirugía estereotáxica y para esto se anestesiaron con isoflurano (inducción 5%, mantenimiento 1-2%) y se colocó una cánula guía (26 Ga, 7 mm de longitud) en el área preóptica. Para esto, los animales fueron colocados en un estereotáxico Modelo 902 Dual Small Animal Stereotaxic Instrument (David Kopf instruments, Tujunga, CA. USA), donde se fijó el cráneo utilizando lápices metálicos. Posterior a esto, con la aplicación de técnica aséptica de la piel del cráneo se realizó una incisión con un bisturí abriendo la piel que recubre el cráneo; el músculo y la fascia

superficial se desplazó hacia un lado para exponer el hueso. Se perforó un pequeño agujero en el hueso parietal para la colocación de un tornillo de acero inoxidable y otro sobre la región de interés (Paxinos y Watson, 2013). Las coordenadas para la colocación de la cánula guía al POA son: anterior-posterior de bregma: +0.34 mm; lateral: línea media sobre bregma; y ventral, 3.4 mm. Esta cánula guía se aseguró con cemento dental al tornillo. Se insertó una cánula simulada con un estilete (31 ga, 7 mm de longitud) en la cánula guía para mantener la permeabilidad y reducir el riesgo de infección.

Al cuarto día de recuperación de la cirugía estereotáxica se realizó el registro de la actividad motora y temperatura central por 24h. Después se realizó la microinyección 4h después del inicio del ciclo de luz (11:00 a.m.) de aCSF, insulina o IL-1 $\beta$  y se registró por dos horas seguido de eutanasia y obtención de tejido adiposo marrón.

#### **8.5 Microinyección en POA.**

Se microinyectó insulina recombinante humana 0.03 UI/0.5  $\mu$ l, IL-1 $\beta$  500 pg/0.5  $\mu$ l o aCSF 0.5  $\mu$ l, directamente en el POA a través de la cánula guía usando un inyector (33 Ga, 7.5 mm de longitud) conectado a un tubo de plástico y una microjeringa en un volumen de 0.5  $\mu$ l (Hamilton Company Reno, Nevada, USA) a una tasa de inyección durante un período de 1 min para permitir la difusión del volumen microinyectado.

#### **8.6 Eutanasia y extracción de tejido BAT.**

Después de dos horas de registro se sacrificaron a los ratones con Isoflurano a dosis terminal (5%). Se disecciona aBAT: es un depósito intermuscular ( $\approx$  100 mg) encontrado directamente debajo de la escápula (hombro cuchillas); mBAT: es un depósito visceral ( $\approx$ 10 mg) que se encuentra en el mediastino. La masa más grande del depósito, que es utilizado en este estudio, se encuentra en el arco de la aorta; iBAT: se quita la piel de la espalda, se identifica una capa de WAT al nivel de los omóplatos. Esta capa cubre los dos lóbulos de iBAT. Se diseccionan estos dos tejidos dorsales dejando intactos los profundos.

## 8.7 PCR en tiempo real.

Para determinar las concentraciones de UCP1 de los subconjuntos de BAT se purificó el ARN total utilizando un kit de ARN (Thermo Fisher). La purificación adicional de ARN se realizó usando el mini kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). La concentración de ARN se determinó a partir de la absorbancia a 260 nm en relación con la absorbancia a 280 nm. El ARN se almacenó a -70 ° C hasta que se realizó la transcripción inversa. Una alícuota (1 µg) de ARN de extracto se transcribió de forma inversa en ADN complementario de primera hebra (ADNc) a 42 ° C durante 40 min, utilizando 100 U/ml de transcriptasa inversa (Applied Biosystem) y 0,1 µM de oligo (dT) - cebador adaptador (Takara) en una mezcla de reacción de 50 µL. Se realizó RT-qPCR semicuantitativa usando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX384 Touch (Bio-Rad). La expresión relativa de ARNm se calculó después de la normalización mediante un promedio de expresión de GAPDH y 18S. Los primers fueron obtenidos de Qiagen de acuerdo al siguiente catálogo.

<b>Primers usados, obtenidos de Qiagen</b>		
<b>Símbolo del gen</b>	<b>Nombre del gen</b>	<b>Número de catalogo</b>
<b>UCP1</b>	Proteína desacoplante 1	PPM05164B
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	PPM05108C
<b>PGC1a</b>	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas, coactivador 1 alfa	PPM033601
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	PPM02946E
<b>18S</b>	ARN ribosómico 18S	PPM72041A

## 8.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se representarán gráficamente con medias +/- error estándar. La significación estadística para las comparaciones múltiples se determinó mediante ANOVA de una o dos vías, con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o la prueba t para datos no apareados (valor P de dos colas). Los gráficos de correlación

se analizaron con regresión lineal (valor P de dos colas, IC del 95%). Se utilizó GraphPad Prism 6 para el análisis estadístico. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 9 Resultados

Para determinar que los animales tienen un ritmo circadiano dependiente del ciclo luz oscuridad y que no tienen alguna condición inflamatoria que altere los resultados se realizó la evaluación de la temperatura corporal por 24h antes de la administración de inyecciones en el área preóptica. Los resultados indican que los tres grupos de animales tuvieron una fluctuación de temperatura circadiana donde el aumento de temperatura correlaciona al estado de actividad durante el ciclo de oscuridad mientras que la disminución de temperatura correlaciona con el periodo de descanso que es durante el periodo de luz (Figura 3). Durante el día del tratamiento, de manera similar a los ratones inyectados con vehículo (aCSF), los animales inyectados con insulina o IL-1 $\beta$  mostraron una elevación de la temperatura corporal central dependiente del estrés en el momento del tratamiento. Sin embargo, la temperatura empieza a disminuir a niveles basales en los grupos inyectados con vehículo y con insulina, pero el grupo inyectado con IL-1 $\beta$  la elevación de la temperatura corporal central persiste elevada en forma significativa y se mantuvo durante las dos horas de registro. El análisis estadístico indica que 50 minutos después de la inyección el valor de la relación  $F = 6.6$  indica que existe una diferencia general entre las medias de la muestra, aCSF ( $36.44 \pm 0.54$  °C), insulina ( $36.54 \pm 0.47$  °C) e IL-1 $\beta$  ( $37.29 \pm 0.52$  °C). El valor  $p = 0.005732$ , y la prueba HSD (diferencia honestamente significativa) de Tukey indica que en los pares de medias existe una diferencia significativa y el resultado es significativo en  $p < 0.05$  ( $\ddagger$  IL-1 $\beta$  vs INS, aCSF). Esta diferencia se mantiene hasta el final del registro que fue terminado a los 120 minutos donde los valores de aCSF ( $34.82 \pm 0.32$  °C), insulina ( $36.39 \pm 0.69$  °C) e IL-1 $\beta$  ( $37.30 \pm 0.64$  °C) mantienen una diferencia de  $p < 0.05$  ( $\ddagger$  IL-1 $\beta$  vs INS, aCSF). Además, a los 75 minutos después de la inyección el valor de la relación  $F = 41.12$  indica que esa diferencia general entre las medias de la muestra es más marcada. El valor  $p = 0.00001$ , la prueba

HSD de Tukey indica que en los pares de medias existe una diferencia significativa y el resultado es significativo en  $p < 0.05$  ( $\ddagger$  IL-1 $\beta$  vs INS, aCSF; # INS vs aCSF).

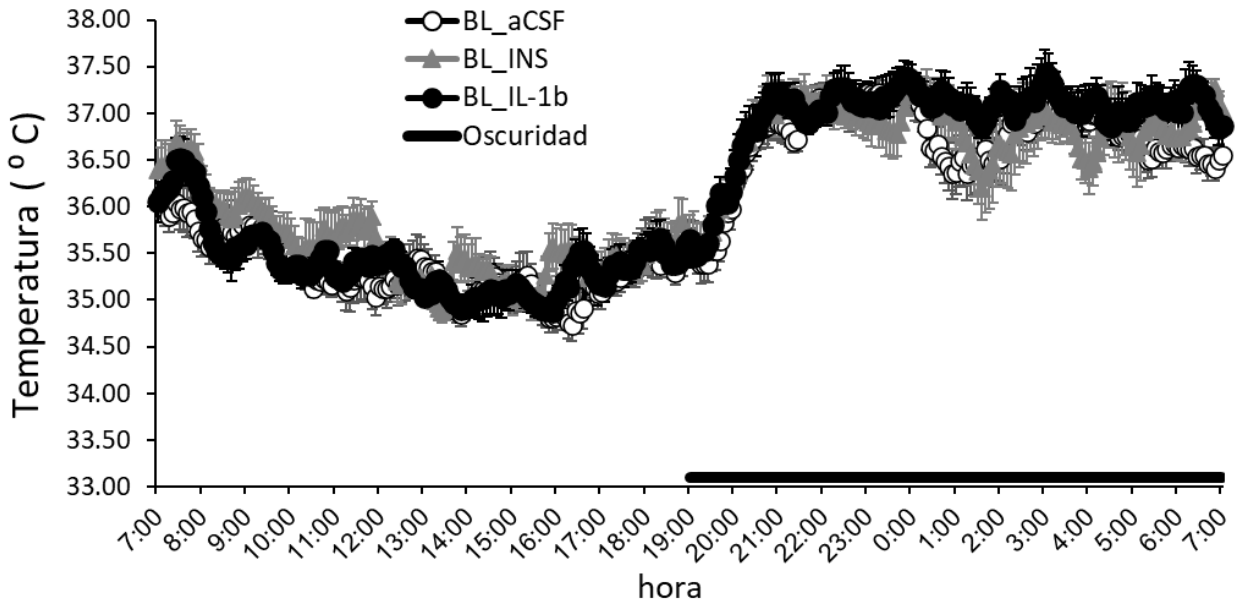


Figura 3. Fluctuación circadiana de temperatura corporal central. La fluctuación de temperatura depende de la del ciclo luz oscuridad siendo mayor en el periodo oscuro y siendo mínimo durante el periodo de luz cuando los animales duermen. Los experimentos se realizaron a las 11 de la mañana que es el periodo estándar de evaluación del efecto farmacológico de drogas hipertérmicas como insulina e IL-1 $\beta$ .

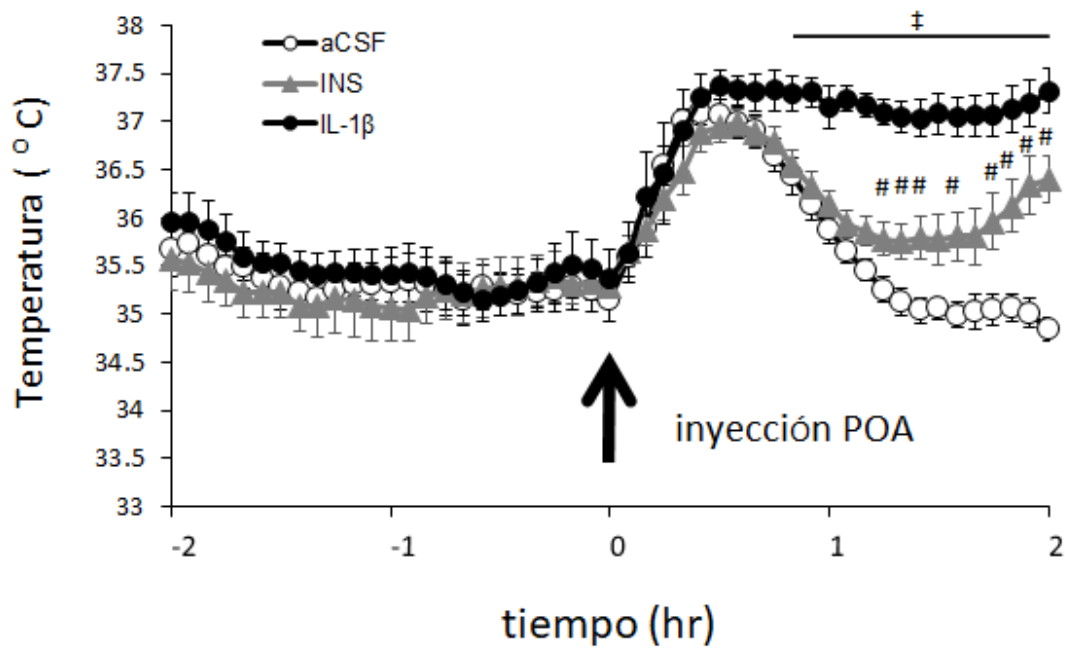


Figura 4. Efecto hipertérmico de IL-1 $\beta$  e insulina inyectados en el área preóptica. Las microinyecciones se realizaron a las 11 de la mañana que es el tiempo 0. Se toman dos horas previas como temperatura basal para descartar efectos hipertérmicos en el animal. De lo contrario son descartados para el experimento. Aumento de temperatura corporal central se eleva por efecto del estrés y manipulación de los animales. Después de 40 minutos la temperatura empieza a bajar a niveles normales, pero para este tiempo la temperatura del grupo tratado con IL-1 $\beta$  se mantiene elevada a diferencia del grupo tratado con insulina o aCSF. A los 75 minutos después de la inyección el grupo de insulina muestra efecto hipertérmico. ‡  $p < 0.05$ , IL-1 $\beta$  vs insulina, aCSF. #  $p < 0.05$  insulina vs aCSF.

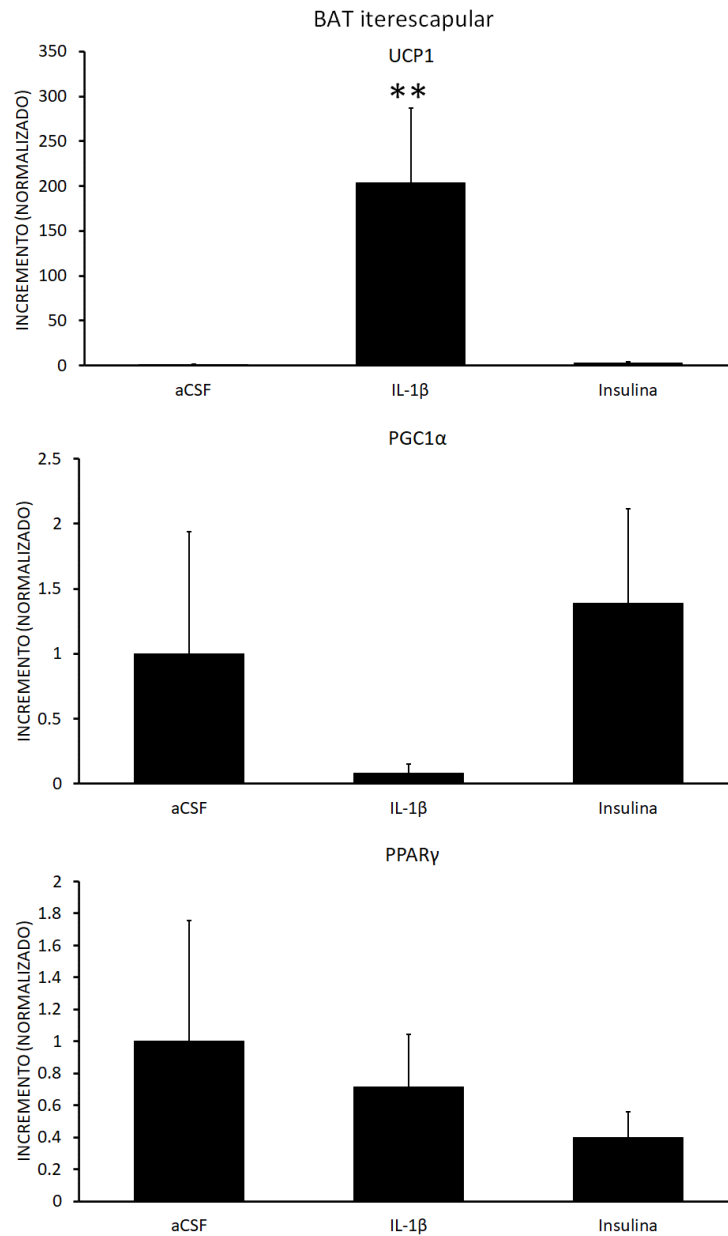


Figura 5. Inducción de UCP1 y genes reguladores en BAT interscapular por administración de IL-1 $\beta$  o insulina. El valor  $p=0.0075$ , y la prueba HSD de Tukey indica que en los pares de medias existe una diferencia significativa y el resultado es significativo para UCP1,  $p < 0.05$  (\*\* IL-1 $\beta$  vs INS, aCSF; IL-1 $\beta$  vs INS,  $p=0.025$ ; IL-1 $\beta$  vs aCSF,  $p=0.010$ ). No cambios significativos en los genes reguladores PGC1 $\alpha$  y PPAR $\gamma$ .

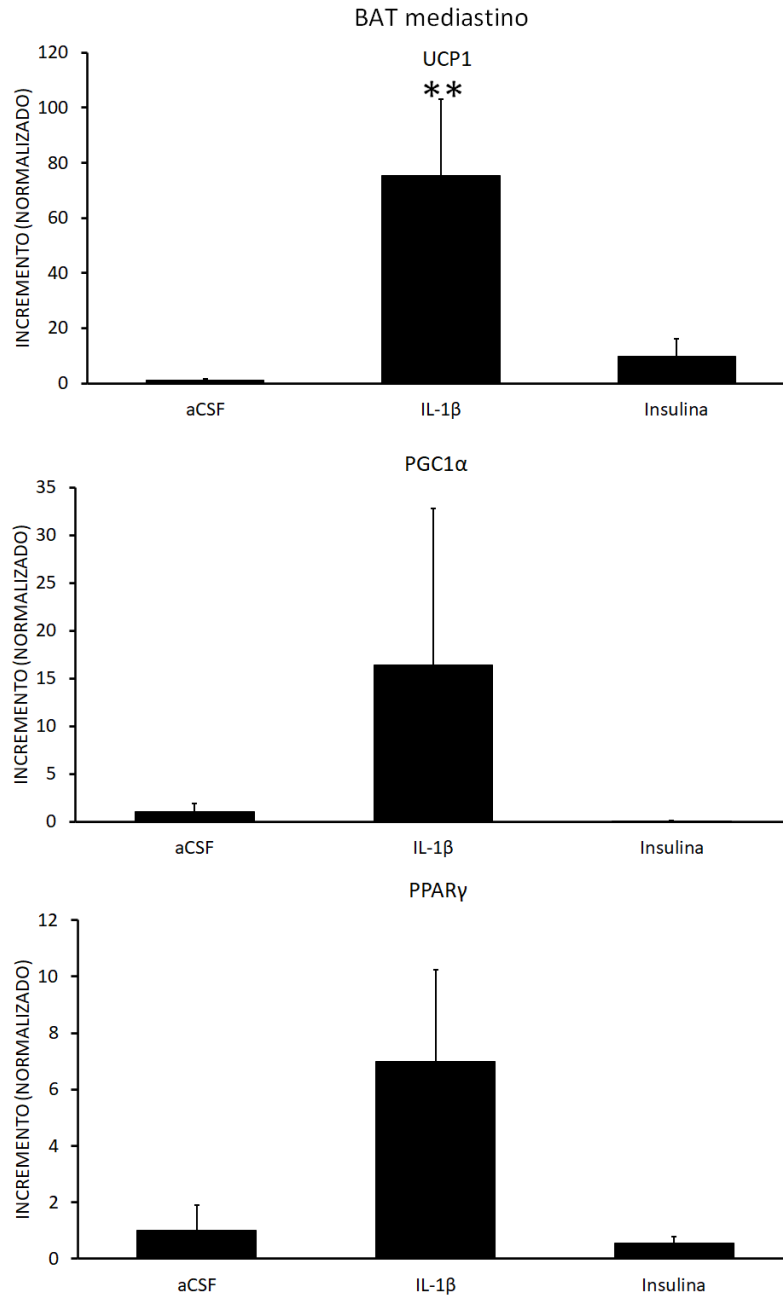


Figura 6. Inducción de UCP1 y genes reguladores en BAT de mediastino por administración de IL-1β o insulina. El valor  $p = 0.0075$  para UCP1, y la prueba HSD de Tukey indica que en los pares de medias existe una diferencia significativa y el resultado es significativo en  $p < 0.05$  (\*\* IL-1β vs INS, aCSF; IL-1β vs INS,  $p = 0.025$ ; IL-1β vs aCSF,  $p = 0.010$ ). No cambios significativos en los genes reguladores PGC1α y PPARγ.

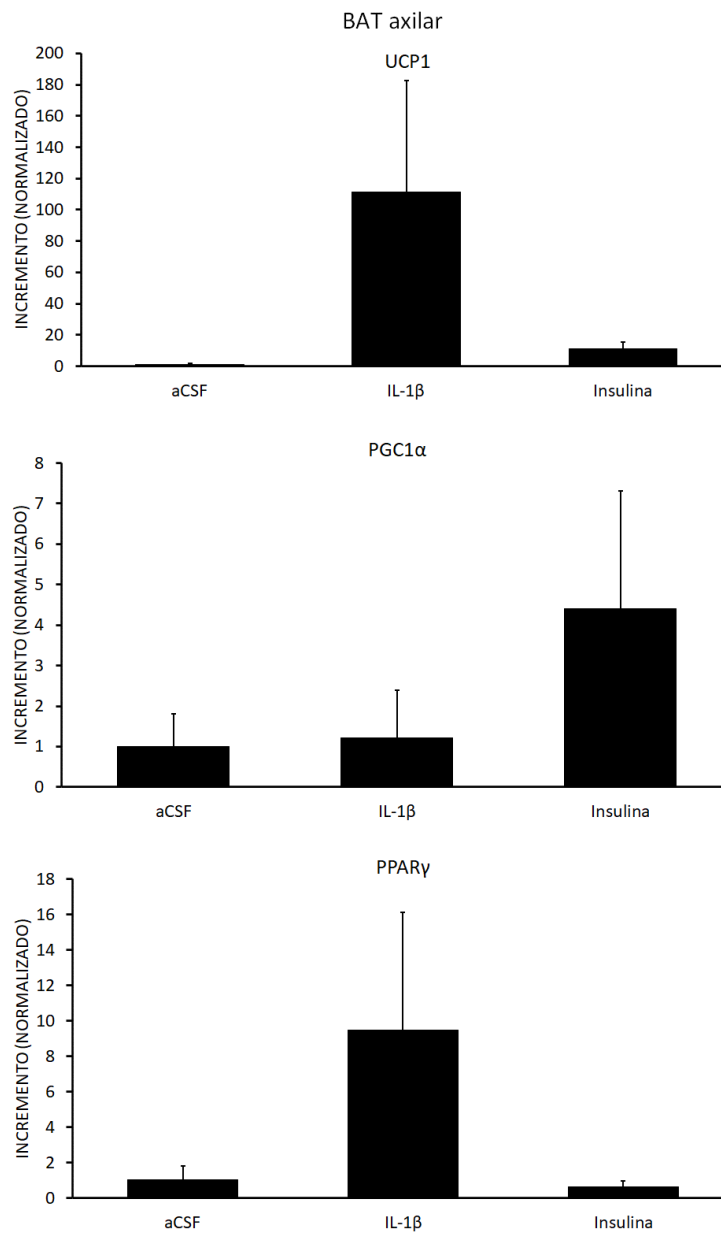


Figura 7. Inducción de UCP1 y genes reguladores en BAT axilar por administración de IL-1β o insulina. El valor de la relación  $F=2.17$ ,  $df(2, 21)$ ,  $p=0.13$  indica que no existe una diferencia general entre las medias de la muestra. Los valores normalizados al grupo control para UCP1 indican CSF (1 + 1.7), insulina (10.8 + 13.3) e IL-1β (111.14 + 201.7).  $p>0.05$ , (IL-1β vs INS,  $p=0.22$ ; IL-1β vs aCSF,  $p=0.16$ ).

## **9.1 Efectos de la administración de IL-1 $\beta$ e insulina en el área preóptica en los genes para UCP1, PGC1 $\alpha$ y PPAR $\gamma$ en tres depósitos de tejido adiposo marrón asociados con el programa termogénico.**

Los cambios en la transcripción de genes que desempeñan funciones importantes en la termogénesis dentro de BAT pueden indicar cómo se produce la influencia de IL-1 $\beta$  e insulina en los circuitos hipotalámicos que controlan termogénesis en BAT. Entre los genes relevantes para la termogénesis en BAT, UCP1 es fundamental en la generación de calor a partir de la respiración mitocondrial (Pollard & Carling, 2020).

Con respecto al tejido adiposo marrón interescapular el análisis estadístico indica que 2 horas después de la inyección de IL-1 $\beta$  o insulina, el valor de la relación  $F= 5.87$ ,  $df (2,21)$  indica que existe una diferencia general entre las medias de la muestra, y los valores normalizados al grupo control: valores normalizados para CSF ( $1 \pm 1.7$ ), insulina ( $2.3 \pm 5.19$ ) e IL-1 $\beta$  ( $203.9 \pm 235.9$ ). El valor  $p= 0.009417$ , y la prueba HSD (diferencia honestamente significativa) de Tukey indica que en los pares de medias existe una diferencia significativa y el resultado es significativo en  $p < 0.05$  (\*\* IL-1 $\beta$  vs INS, aCSF). Esta diferencia (\*\* IL-1 $\beta$  vs INS,  $p=0.018$ ; IL-1 $\beta$  vs aCSF,  $p=0.019$ ) confirma que en el tejido subescapular la inducción de UCP1 está activado por los circuitos autonómicos modulados por área preóptica. La diferencia entre aCSF vs INS,  $p=0.99$  indica que el rol de la activación de BAT subescapular por inyección de insulina en el área preóptica no requiere la inducción de UCP1 y que el efecto termogénico pueda involucrar otras vías que no requieren BAT. Con respecto a los genes moduladores el análisis estadístico indica que para el gen PGC1 $\alpha$  el valor de  $F=0.9$ ,  $df (2,21)$ ,  $p=0.4$ , mientras que para el gen PPAR $\gamma$  el valor de  $F=0.3$ ,  $df (2,21)$ ,  $p=0.68$  lo que indica que estos genes no participan en la modulación de la inducción de UCP1 (Figura 5).

Con respecto al tejido adiposo marrón del mediastino, el valor de la relación  $F=6.2$  indica que existe una diferencia general entre las medias de la muestra, y los valores

normalizados al grupo control indican CSF ( $1 \pm 1.2$ ), insulina ( $9.8 \pm 17.3$ ) e IL-1 $\beta$  ( $75.4 \pm 77.9$ ). El valor  $p=0.0075$ , y la prueba HSD de Tukey indica que en los pares de medias existe una diferencia significativa y el resultado es significativo en  $p < 0.05$  (\*\* IL-1 $\beta$  vs INS, aCSF). Esta diferencia (\*\* IL-1 $\beta$  vs INS,  $p=0.025$ ; IL-1 $\beta$  vs aCSF,  $p=0.010$ ) confirma que en el tejido de mediastino al igual que el tejido subescapular la inducción de UCP1 está activado por los circuitos autonómicos modulados por área preóptica. La diferencia entre aCSF vs INS,  $p=0.92$  indica que el rol de la activación de BAT subescapular por inyección de insulina en el área preóptica no requiere la inducción de UCP1 y que al igual que el tejido subescapular el efecto termogénico pueda involucrar otras vías que no requieren BAT. Con respecto a los genes moduladores el análisis estadístico indica que para el gen PGC1 $\alpha$  el valor de  $F=0.84$ ,  $df(2,21)$ ,  $p=0.43$ , mientras que para el gen PPAR $\gamma$  el valor de  $F=3.4$ ,  $df(2,21)$ ,  $p=0.052$  lo que indica que estos genes no participan en la modulación de la inducción de UCP1 (Figura 6).

Con respecto al tejido adiposo marrón axilar, el valor de la relación  $F=2.17$ ,  $df(2,21)$ ,  $p=0.13$  indica que no existe una diferencia general entre las medias de la muestra. Los valores normalizados al grupo control indican CSF ( $1 \pm 1.7$ ), insulina ( $10.8 \pm 13.3$ ) e IL-1 $\beta$  ( $111.14 \pm 201.7$ ). La prueba HSD de Tukey indica que en los pares de medias no existe una diferencia significativa,  $p > 0.05$ , (IL-1 $\beta$  vs INS,  $p=0.22$ ; IL-1 $\beta$  vs aCSF,  $p=0.16$ ) La diferencia entre aCSF vs INS,  $p=0.98$  indica que el rol de la activación de BAT axilar por inyección de insulina o IL-1 $\beta$  en el área preóptica no requiere la inducción de UCP1 y que al igual que el tejido subescapular el efecto termogénico pueda involucrar otras vías que no requieren BAT axilar. Con respecto a los genes moduladores el análisis estadístico indica que para el gen PGC1 $\alpha$  el valor de  $F=1.1$ ,  $df(2,21)$ ,  $p=0.35$ , mientras que para el gen PPAR $\gamma$  el valor de  $F=1.6$ ,  $df(2,21)$ ,  $p=0.21$  lo que indica que estos genes no participan en la respuesta térmica a la aplicación de insulina o IL-1 $\beta$  (Figura 7).

Nuestros resultados indican que en tejido adiposo marrón interescapular y mediastínico la transcripción de UCP1 fue modulada por el tratamiento con IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ). Con respecto a los genes reguladores no se observaron cambios significativos en ningún depósito de tejido adiposo marrón. La expresión de PPAR $\gamma$  y PGC1 $\alpha$  que son

dos factores clave que determinan la diferenciación de preadipocitos hacia adipocitos marrones no tuvieron cambios significativos con los tratamientos con IL-1 $\beta$  o insulina.

## 10 Discusión.

La termogénesis es el proceso de producción de calor en organismos y tiene lugar en estructuras especializadas. La temperatura corporal central y la homeostasis de los nutrientes son componentes importantes del equilibrio energético que están reguladas centralmente por núcleos y neuronas hipotalámicas. El área preóptica es esencial para la regulación de CBT (Boulant, 1998). Esta región contiene neuronas sensibles a la temperatura que son consideradas fundamentales para detectar y responder a los cambios de temperatura local y de la piel (Tan et al., 2018). La homeostasis de nutrientes está regulada por diferentes regiones hipotalámicas como el núcleo paraventricular y el núcleo arqueado, que contienen neuronas que responden a los cambios en el nivel de glucosa, lípidos, grelina, leptina e insulina (Plum et al., 2005). La inyección intracerebroventricular de insulina alcanza al hipotálamo anterior y reduce la actividad unitaria de las neuronas del POA sensibles temperatura (Wang & Lin, 1985) pero la respuesta es más específica cuando se inyecta directamente en esta área donde se encuentran las neuronas GABAérgicas que expresan el receptor a insulina y son inhibidas (Sanchez-Alavez et al., 2010). El efecto térmico de insulina se asemeja al efecto pirogénico de la IL-1 $\beta$  (Sanchez-Alavez et al., 2006; Nakamura & Morrison, 2007; Nakamura & Morrison, 2011). Aunque todavía se desconoce si la insulina activa a las mismas neuronas GABAérgicas sensibles al calor activadas por IL-1 $\beta$  nuestros datos apoyan la idea de que serían diferentes grupos neuronales los que podrían tener proyecciones específicas a sistemas termogénicos. Un experimento crítico que apoya esta observación es el uso de animales que carecen del receptor cerebral a insulina que es el modelo de ratón NIRKO (neuronal insulin receptor knock out model). Al inyectar insulina en el área preóptica nuestro grupo encontró que la respuesta termogénica estaba ausente mientras que la administración de IL-1 $\beta$  indujo termogénesis (Sanchez-Alavez et al., 2011). Es importante mencionar que cuando se realizan evaluaciones de actividad unitaria en rebanas de cerebro de ratón que contienen el área preóptica, no

todas las neuronas sensibles a calor respondieron a la insulina, lo que indica que estas neuronas GABAérgicas constituyen una población heterogénea de neuronas y que la insulina inhibe solo un subconjunto de estas neuronas (Sanchez-Alavez et al., 2010); sin embargo, este subconjunto representa una entrada lo suficientemente potente para que la regulación BAT cause una respuesta hipertérmica, aunque nuestros experimentos en este trabajo indiquen que la magnitud de estimulación de UCP1 no sea significativa en ninguno de los subconjuntos de tejido adiposo marrón evaluados. Por tanto, podríamos apoyar la idea de que las neuronas GABAérgicas sensibles a calor y que responden al efecto inhibitorio de la insulina serían parte de un sistema que tiene efecto específico para el equilibrio energético y pueden participar en los efectos térmicos de los alimentos, un fenómeno inversamente correlacionado con el grado de resistencia a la insulina y de la grasa corporal y propuesto como importante en el desarrollo de la obesidad (Bo et al., 2020). El hecho de demostrar el efecto hipertérmico de la insulina sugiere un vínculo importante entre la termorregulación y la homeostasis energética, aunque se abre las puertas de explorar aún más el resto de los depósitos de tejido adiposo marrón y proponer que existen otros sistemas, como vasoconstricción o aumento de actividad muscular, controlados por el área preóptica que puedan incrementar la producción o retención de calor después de la administración de insulina.

## **11 Conclusiones**

Insulina e IL-1 $\beta$  inducen hipertermia cuando se inyectan localmente en hipotálamo anterior en el área preóptica de ratón. El nivel de respuesta de la hipertermia es significativamente mayor en el grupo tratado con IL-1 $\beta$  y esto se ve reflejado en la inducción de UCP1 en dos (BAT interescapular y mediastino) de los tres subconjuntos de tejido adiposo marrón estudiados. Con estos datos podemos apoyar los hallazgos previos donde el tratamiento con insulina en ratones NIRKO que carecen del receptor a insulina son capaces de responder a IL-1 $\beta$  o bien montar una respuesta hipertérmica con IGF-1 pero no con insulina. Se puede concluir que diferentes poblaciones GABAérgicas que tienen los receptores para insulina o para IL-1 $\beta$  se organizan para modular la

respuesta hipertérmica a través de la activación periférica de diferentes sistemas encaminados a participar a una función inflamatoria o una regulación energética.

## 12 Referencias

Abbott, A., Bueno, R., Pedrini, M., Murray, J., & Smith, R. (1992). Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10759–10763.

Algire, C., Medrikova, D., & Herzig, S. (2013). White and brown adipose stem cells: from signaling to clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(5), 896–904. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2012.10.001>

Bartfai T, Sanchez-Alavez M, Andell-Jonsson S, Schultzberg M, Vezzani A, Danielsson E, Conti B. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Oct;1113:173-7. Epub 2007 Jul 26. PubMed PMID: 17656565.ntracelulares.

Belfiore, A., Frasca, F., Pandini, G., Sciacca, L., & Vigneri, R. (2009). Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocrine Reviews*, 30(6), 586–623. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0047>

Bo, S., Fadda, M., Fedele, D., Pellegrini, M., Ghigo, E., & Pellegrini, N. (2020). A Critical Review on the Role of Food and Nutrition in the Energy Balance. *Nutrients*, 12(4), 1161. <https://doi.org/10.3390/nu12041161>

Boulant, J. A., & Hardy, J. D. (1974). The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurons. 639–660.

Boulant J. A. (1998). Hypothalamic neurons. Mechanisms of sensitivity to temperature. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856, 108–115. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08319.x>

Brown, E. L., Hazen, B. C., Eury, E., Watzek, J. S., Gantner, M. L., Albert, V., Chau, S., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., & Kralli, A. (2018). Estrogen-Related Receptors Mediate the Adaptive Response of Brown Adipose Tissue to Adrenergic Stimulation. *IScience*, 2, 221–237. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.03.005>

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2003>

Cao, W. H., Fan, W., & Morrison, S. F. (2004). Medullary pathways mediating specific sympathetic responses to activation of dorsomedial hypothalamus. *Neuroscience*, 126(1), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.013>

Cao W, Daniel KW, Robidoux J, Puigserver P, Medvedev AV, Bai X, Floering LM, Spiegelman BM, Collins S p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr; 24(7):3057-67.

Cao, H., Sekiya, M., Ertunc, M. E., Burak, M. F., Mayers, J. R., White, A., Inouye, K., Rickey, L. M., Ercal, B. C., Furuhashi, M., Tuncman, G., & Hotamisligil, G. (2013). Adipocyte lipid chaperone AP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metabolism*, 17(5), 768–778. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.012>.

Chouchani, E. T., Kazak, L., & Spiegelman, B. M. (2019). New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond. *Cell Metabolism*, 29(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>

Cinti, S. (2012). The adipose organ at a glance. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 5(5), 588–594. <https://doi.org/10.1242/dmm.009662>

Corina-Sosa, B., Basurto, L., Luqueño, E., Robledo, A., Mendieta-Zerón, H., & Oros-Pantoja, R. (2020). Los colores del tejido adiposo y la relación con la irisina. *Cirugia y Cirujanos*, 88(5), 664–671. <https://doi.org/10.24875/CIRU.20000057>

da Conceição, E. P. S., Morrison, S. F., Cano, G., Chiavetta, P., & Tupone, D. (2020). Median preoptic area neurons are required for the cooling and febrile activations of brown adipose tissue thermogenesis in rat. *Scientific Reports*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74272-w>

da Conceição Furber EPS, Mota CMD, Veytsman E, Morrison SF, Madden CJ. Dopaminergic Input from the Posterior Hypothalamus to the Raphe Pallidus Area Inhibits Brown Adipose Tissue Thermogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2021 Oct 27. doi: 10.1152/ajpregu.00149.2021. Epub ahead of print. PMID: 34704845.

Davis, C. N., Tabarean, I., Gaidarova, S., Behrens, M. M., & Bartfai, T. (2006). IL-1beta induces a MyD88-dependent and ceramide-mediated activation of Src in anterior hypothalamic neurons. *Journal of neurochemistry*, 98(5), 1379–1389.

de Jonge, L., & Bray, G. A. (1997). The thermic effect of food and obesity: a critical review. *Obesity research*, 5(6), 622–63. <https://doi.org/10.1002/j.15508528.1997.tb00584.x>

de Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2015). A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism*, 308(12), E1085–E1105.

Denley, U., Wallece, J., Cosgrove, L., & Forbes, S. (2003). The insulin receptor isoform exon 11- (IR-A) in cancer and other diseases: a review. *Hormone and Metabolic Research*, 35(11–12), 778–785. <https://doi.org/10.1055 / s-2004-814157>

Eberwine, J., & Bartfai, T. (2011). Single cell transcriptomics of hypothalamic warm sensitive neurons that control core body temperature and fever response Signaling asymmetry and an extension of chemical neuroanatomy. *Pharmacology & therapeutics*, 129(3), 241–259. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.09.010>

Endo Y, Blinova K, Romantseva T, Golding H, Zaitseva M. Differences in PGE2 production between primary human monocytes and differentiated macrophages: role of IL-1 $\beta$  and TRIF/IRF3. *PLoS One*. 2014 May 28;9(5):e98517. doi:10.1371/journal.pone.0098517. eCollection 2014. PubMed PMID: 24870145; PubMed Central PMCID: PMC4037220.

Engström L, Ruud J, Eskilsson A, Larsson A, Mackerlova L, Kugelberg U, Qian H, Vasilache AM, Larsson P, Engblom D, Sigvardsson M, Jönsson JI, Blomqvist A. Lipopolysaccharide-induced fever depends on prostaglandin E2 production specifically in brain endothelial cells. *Endocrinology*. 2012 Oct;153(10):4849-61. Epub 2012 Aug 7. PubMed PMID: 22872578.

Frontini, A., & Cinti, S. (2010). Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metabolism*, 11(4), 253–256. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.004>

Frühbeck, G. (2008). Overview of Adipose Tissue and Its Role in Obesity and Metabolic Disorders. In *Methods in molecular biology* (Vol. 456, pp. 1–22). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-245-8_1)

Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G., & Cinti, S. (2014). White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *European Journal of Endocrinology*, 170(5), 159–171. <https://doi.org/10.1530 / EJE-13-0945>

Gutiérrez-Ruiz, J., Velázquez-Paniagua, M., & Prieto-Gómez, B. (2011). El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Revista de Endocrinología y Nutrición*, 19(4), 154–162. <http://www.medigraphic.com/endocrinologia>.

Ikeda, K., & Yamada, T. (2020). UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. *Frontiers in endocrinology*, 11, 498. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00498>.

Jung, S. M., Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2019). Brown Adipose Tissue Development and Metabolism. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 251, 3–36. <https://doi.org/10.1007/164>

Kajimura, S., Spiegelman, B. M., & Seale, P. (2015). Brown and Beige Fat: Physiological Roles beyond Heat Generation. *Cell Metabolism*, 22(4), 546–559. <https://doi.org/10.1016 / j.cmet.2015.09.007>

Kalinovich, A. V., de Jong, J. M. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2017). UCP1 in adipose tissues: two steps to full browning. *Biochimie*, 134, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.007>

Keipert, S., Kutschke, M., Lamp, D., Brachthäuser, L., Neff, F., Meyer, C. W., Oelkrug, R., Kharitononkov, A., & Jastroch, M. (2015). Genetic disruption of uncoupling protein 1 in mice renders brown adipose tissue a significant source of FGF21 secretion. *Molecular Metabolism*, 4(7), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.04.006>

Kim, J. j., & Accili, D. (2002). Signalling through IGF-I and insulin receptors: where is the specificity? *Growth Horm*, 12(2), 84–90. <https://doi.org/10.1054/ghir.2002.0265>

Klein I, Sanchez-Alavez M, Tabarean I, Schaefer J, Holmberg KH, Klaus J, Xia F, Marcondes MC, Dubins JS, Morrison B, Zhukov V, Sanchez-Gonzalez A, Mitsukawa K, Hadcock JR, Bartfai T, Conti B. AdipoR1 and 2 are expressed on warm sensitive neurons of the hypothalamic preoptic area and contribute to central hyperthermic effects of adiponectin. *Brain Res*. 2011 Nov 14;1423:1-9. doi: 10.1016/j.brainres.2011.09.019. Epub 2011 Sep 17. PMID: 22000082; PMCID: PMC3215583

Kleinridders, A., Ferris, H. A., Cai, W., & Kahn, C. R. (2014). Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes*, 63(7), 2232–2243. <https://doi.org/10.2337/db14-0568>

Lapid, K., & Graff, J. M. (2017). Form ( ul ) ation of adipocytes by lipids. *Adipocyte*, 6(3), 176–186. <https://doi.org/10.1080 / 21623945.2017.1299298>

Lee, Y. H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.011>

Leibowitz, S. F., & Wortley, K. E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides*, 25(3), 473–504. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.02.006>

Lynes, M. D., & Tseng, Y. H. (2018). Deciphering adipose tissue heterogeneity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 5–20. <https://doi.org/10.1111/nyas.13398>

Lubkowska A, Szymański S, Chudecka M (2020) Neonatal thermal response to childbirth: Vaginal delivery vs. caesarean section. *PLoS ONE* 15(12): e0243453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243453>

Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2019). Central nervous system circuits that control body temperature. *Neurosci Lett*, 696, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.027>

McAllen, R. M., Tanaka, M., Ootsuka, Y., & McKinley, M. J. (2010). Multiple thermoregulatory effectors with independent central controls. *European journal of applied physiology*, 109(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/s00421-009-1295-z>

Miletta, M. C., & Horvath, T. L. (2018). From white to beige: a new hypothalamic pathway. *EMBO Reports*, 19(4), 1–2. <https://doi.org/10.15252/embr.201845928>

Mohammed, M., Madden, C. J., Burchiel, K. J., & Morrison, S. F. (2018). Preoptic area cooling increases the sympathetic outflow to brown adipose tissue and brown adipose tissue thermogenesis. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 315, R609–R618. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2018>

Morrison, S. F. (2016). Central control of body temperature [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, 5(5), 1–10. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7958.1>

Morrison, S. F., Madden, C. J., & Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metabolism*, 19(5), 741–756. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.007>

Mota CMD, Branco LGS, Morrison SF, Madden CJ. Systemic serotonin inhibits brown adipose tissue sympathetic nerve activity via a GABA input to the dorsomedial hypothalamus, not via 5HT1A receptor activation in raphe pallidus. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020 Mar;228(3):e13401. doi: 10.1111/apha.13401. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31599481; PMCID: PMC7035194.

Mohammed, M., Madden, C. J., Burchiel, K. J., & Morrison, S. F. (2018). Preoptic area cooling increases the sympathetic outflow to brown adipose tissue and brown adipose tissue thermogenesis. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 315(4), R609–R618. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00113.2018>

Nakamura, K., & Morrison, S. F. (2007). Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(1), R127–R136. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00427.2006>

Nakamura, K., & Morrison, S. F. (2011). Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *Journal of Physiology*, 589(14), 3641–3658. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210047>

NAKAYAMA, T., EISENMAN, J. S., & HARDY, J. D. (1961). Single unit activity of anterior hypothalamus during local heating. *Science (New York, N.Y.)*, 134(3478), 560–561. <https://doi.org/10.1126/science.134.3478.560>

Oberbauer, A. (2013). The Regulation of IGF-1 Gene Transcription and Splicing during Development and Aging. *Frontiers in Endocrinology*, 4, 39. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00039>

Pallubinsky, H., Schellen, L., & van Marken Lichtenbelt, W. D. (2019). Exploring the human thermoneutral zone – A dynamic approach. *Journal of Thermal Biology*, 79(August 2018), 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.12.014>

Pandini, G., Frasca, F., Mineo, R., Sciacca, L., Vigneri, R., & Belfiore, A. (2002). Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(42), 39684–39695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202766200>

Paxinos, G., Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Hard Cover Edition, 7th Edition - October 24, 2013, eBook ISBN: 9780124157521

Plum, L., Schubert, M., & Brüning, J. C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 16(2), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>

Pollard, A. E., & Carling, D. (2020). Thermogenic adipocytes: lineage, function and therapeutic potential. *Biochemical Journal*, 477(11), 2071–2093. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200298>

Rajan, S., Gupta, A., Beg, M., Shankar, K., Srivastava, A., Varshney, S., Kumar, D., & Gaikwad, A. N. (2014). Adipocyte transdifferentiation and its molecular targets. *Differentiation*, 87(5), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.07.002>

Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, 156, 20–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.012>

Sacco, A., Morcavallo, A., Pandini, G., Vigneri, R., & Belfiore, A. (2009). Differential signaling activation by insulin and insulin-like growth factors I and II upon binding to insulin receptor isoform A. *Endocrinology*, 150(8), 3594–3602. <https://doi.org/10.1210/es.2009-0377>

Sanchez-Alavez, M., Tabarean, I. V., Behrens, M. M., & Bartfai, T. (2006). Ceramide mediates the rapid phase of febrile response to IL-1beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2904–2908. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510960103>

Sanchez-Alavez, M., Tabarean, I. V., Osborn, O., Mitsukawa, K., Schaefer, J., Dubins, J., Holmberg, K. H., Klein, I., Klaus, J., Gomez, L. F., Kolb, H., Secret, J., Jochems, J., Myashiro, K., Buckley, P., Hadcock, J. R., Eberwine, J., Conti, B., & Bartfai, T. (2010). Insulin causes hyperthermia by direct inhibition of warm-sensitive neurons. *Diabetes*, 59(3), 43–50. <https://doi.org/10.2337/db09-1128>

Sanchez-Alavez, Manuel, Osborn, O., Tabarean, I. V., Holmberg, K. H., Eberwine, J., Kahn, C. R., & Bartfai, T. (2011). Insulin-like growth factor 1-mediated hyperthermia involves anterior hypothalamic insulin receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14983–14990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.188540>

Sandeep Ravindran. Profile of Bruce A. Beutler. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Aug 2013, 110 (32) 12857-12858; DOI: 10.1073/pnas.1311624110.

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*. 2008 Aug 21; 454(7207):961-7.

Simm B, Ott D, Pollatzek E, Murgott J, Gerstberger R, Rummel C, Roth J. Effects of prostaglandin E2 on cells cultured from the rat organum vasculosum laminae terminalis and median preoptic nucleus. *Neuroscience*. 2016 Jan 28;313:23-35. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.11.034. Epub 2015 Nov 23. PubMed PMID: 26608124.

Song, T., & Kuang, S. (2019). Adipocyte dedifferentiation in health and diseases. *Clinical Science*, 133(20), 2107–2119. <https://doi.org/10.1042/CS20190128>

Soto, M., Cai, W., Konishi, M., & Kahn, C. R. (2019). Insulin signaling in the hippocampus and amygdala regulates metabolism and neurobehavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(13), 6379–6384. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817391116>

Spaethling, J. M., Sanchez-Alavez, M., Lee, J., Xia, F. C., Dueck, H., Wang, W., Fisher, S. A., Sul, J. Y., Seale, P., Kim, J., Bartfai, T., & Eberwine, J. (2016). Single-cell transcriptomics and functional target validation of brown adipocytes show their complex roles in metabolic homeostasis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(1), 81–92. <https://doi.org/10.1096/fj.15-273797>

Spiegelman, B., & Flier, J. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531–543. [https://doi.org/10.1016 / s0092-8674 \(01\) 00240-9](https://doi.org/10.1016 / s0092-8674 (01) 00240-9)

Symonds, M. E., Aldiss, P., Pope, M., & Budge, H. (2018). Recent advances in our understanding of brown and beige adipose tissue: The good fat that keeps you healthy [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, 7(0), 1129.

Tan CL, Knight ZA. Regulation of Body Temperature by the Nervous System. *Neuron*. 2018;98(1):31-48. doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.022

Tan, C. L., Cooke, E. K., Leib, D. E., Lin, Y., Gwendolyn, E., Zimmerman, C. A., & Knight, Z. A. (2017). Supplemental Information Warm-Sensitive Neurons that Control Body Temperature. *Cell*, 167(1), 47–59.

Tang, Q. Q., & Lane, M. D. (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*, 81, 715–736. <https://doi.org/10.1146 / annurev-biochem-052110-115718>

Tupone, D., Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2014). Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: Potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 8(FEB), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00014>

Villarroya, F., & Vidal-Puig, A. (2013). Beyond the sympathetic tone: the new brown fat activators. *Cell Metabolism*, 17(5), 638–643. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.020>

Vosselman, M., Lichtenbelt, W. D. van M., & Schrauwen, P. (2013). Energy dissipation in brown adipose tissue: from mice to men. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 379(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.017>

Wang HS, Lin MT. Effects of insulin on thermoregulatory responses and hypothalamic neuronal activity. *Pharmacology*. 1985;30(2):86-94. doi: 10.1159/000138055. PMID: 3883371.

Wang, G.-X., Xu-Yun, Z., Zhuo-Xian, M., Kern, M., Dietrich, A., Chen, Z., Cozacov, Z., Zhou, D., Okunade, A. L., Su, X., Li, S., Blüher, M., & Lin, J. D. (2014). The brown fat-enriched secreted factor Nrg4 preserves metabolic homeostasis through attenuation of hepatic lipogenesis. *Nat Med*, 20(12), 1436–1443. <https://doi.org/10.1038/nm.3713>