



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Regulación de los Sistemas TRHérgicos del hipotálamo  
durante la obesidad inducida por dieta alta en grasa en la  
rata.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

TORRES REYES MARIA DEL PILAR

DIRECTOR DE TESIS:

Doctora Rosa Maria Uribe Villegas

2014



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Apellido paterno  
Apellido materno  
Nombre(s)  
Teléfono  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

1. Datos del alumno

Torres  
Reyes  
Maria del Pilar  
13 14 19 80  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
304161333

2. Datos del tutor

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dra.  
Rosa Maria  
Uribe  
Villegas

3. Datos del sinodal 1

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dr.  
Jean Louis  
Charli  
Casalonga

4. Datos del sinodal 2

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Dra.  
Milagros  
Méndez  
Ubach

5. Datos del sinodal 3

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

M. en C.  
Georgina  
Nieto  
Castañeda

6. Datos del sinodal 4

Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

Quim.  
Viviana  
Escobar  
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito.

Título  
Subtítulo  
Número de páginas  
Año

Regulación de los Sistemas TRHérgicos del hipotálamo durante la obesidad inducida por dieta alta en grasa  
78 p.  
2014

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me brindaron su apoyo, así que es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mi más sincero agradecimiento. De manera muy especial y sincera agradezco a la Dra. Rosa María Uribe Villegas por aceptar ser mi asesora y apoyarme para realizar esta tesis y al Dr. Jean-Louis Charli Casalonga por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. A ellos por la confianza, el apoyo personal y académico que me brindaron desde el primer momento. Con su dedicación y compromiso por la ciencia y la formación de alumnos me motivan para seguir en el mundo científico en busca del conocimiento.

Agradezco la orientación y aportaciones hechas durante mi estancia en el laboratorio a la Dra. Patricia Joseph, la Dra. Antonieta Cote, la Dra. Mariana Gutierrez y la Dra. Lorraine Jaimes.

Gracias los miembros del jurado la Dra. Milagros Méndez, la M. en C. Georgina Nieto y a la Quím. Viviana Escobar Sánchez por dedicar su tiempo para la lectura y análisis de este trabajo, también a mis profesoras Sara Frías y Bertha Molina. Todas me encaminaron y me ayudaron a reafirmar mi gusto por la biología molecular.

Quiero agradecer al personal técnico del Instituto de biotecnología que contribuyó a la realización de este proyecto: I.B.I. Marcela Ramírez Yarza (producción y cuidado de animales de experimentación en el bioterio), Q.F.B Miguel Cisneros Ramírez (apoyo en la realización de RIAs y ELISAs), M.C. Eugenio López Bustos y Quím. Fidelia Romero Arteaga (síntesis de oligonucleótidos y preparación de reactivos para PCR respectivamente), Sr. Manuel Villa y a la Sra. Elena Martel por facilitar los materiales utilizados, B.A. Shirley Ainsworth (apoyo en la obtención de bibliografía). Al apoyo otorgado por parte del CONACyT (proyecto 128665), DGAPA (proyecto IN212411) y a la beca SNI (exp. 12128290).

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios por darme una gran familia y permitirme terminar este proyecto.

A mi Má siempre sonriente, que sin su alegría mi vida no sería la misma. Quien sin saberlo me ha enseñado a burlar los malos momentos con una sonrisa y aceptar los buenos con una mucho más grande. Gracias a su fortaleza y entereza siempre hemos salido adelante. La admiro por todo lo que ha hecho y sigue haciendo. Gracias Vini por consentirme, por ser mi “miga” y confidente, por quererme y abrazarme siempre que lo necesito, por estar conmigo siempre. No tengo palabras para decirte todo lo que representas para mi, solo que te quiero tanto tanto que daría todo solo para que tú fueras feliz.

A mis hermanos Jaime, Hector, Alfredo, Beto, Laura y Carmen por hacer un gran esfuerzo (que sé que es bastante) para que yo terminara esta gran etapa de mi vida, sin ustedes esto no sería posible. Muchas gracias hermanos!! A pepino que nos ha hecho mas divertida la vida.

A amigos del laboratorio Iván, Israim, Adrian, Gaby, Yesica y a mis amigas de siempre: las dos Andrea y Laura, a Vero, Susy y Marelita. Gracias por escuchar, apoyar y alentarme, por aceptar mi sinceridad y por estar conmigo cuando lo necesito, sé que seguiran estando.

A Carlos por acompañarme en este viaje (en tantos viajes), por los pasteles y los dulces. Por las comidas y risas compartidas desde que nos conocimos, al parecer se nos ha ido el tiempo en esas delicias. Por aceptarme como soy, consentirme siempre y estar conmigo en todo momento.

Gracias a todos los mencionados y no mencionados que directa o indirectamente me ayudaron a crecer personal y profesionalmente, a creer en mi y poder seguir adelante.

## INDICE

1. ABREVIATURAS.....	6
2. RESUMEN.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	9
3.1. Definición de la obesidad en el humano.....	9
3.2. Estrategias para combatir la obesidad.....	10
4. Elementos involucrados en el control del consumo de Alimento y gasto energético.....	13
4.1. Hipotálamo: centro de regulación homeostática del metabolismo.....	16
4.2. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la regulación de su metabolismo por alteración de la homeostasis energética .....	20
5. El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) y la obesidad.....	25
6. Modelos Experimentales para estudiar la obesidad.....	27
6.1. Animales obesos generados por alteraciones genéticas.....	27
6.2. Animales obesos obtenidos por alimentación con dietas hipercalóricas..	28
7. JUSTIFICACIÓN.....	30
8. HIPÓTESIS.....	30
9. OBJETIVO GENERAL.....	31
9.1. Objetivos particulares.....	31
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
10.1. Protocolo experimental para inducir obesidad en la rata macho Wistar..	32
10.2. Disección de cerebros.....	33
10.3. Purificación y cuantificación del RNA total de los diferentes núcleos del hipotálamo.....	33
10.4. Cuantificación de la presencia de los RNA mensajeros específicos (TRH, TRH-R1, TRH-R2, PPII) en diferentes regiones del hipotálamo.....	35
10.5. Determinación del nivel de leptina en suero mediante el ensayo de ELISA.....	36
10.6. Determinación del nivel de insulina en suero mediante el ensayo de ELISA.....	36
10.7. Cuantificación por radioinmunoensayo de la tirotrópina (TSH), corticosterona, triiodotironina (T <sub>3</sub> ) y tiroxina (T <sub>4</sub> ) en suero.....	37

10.8. Determinación electroquímica de glucosa en suero.....	39
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	40
12. RESULTADOS.....	40
12.1. Determinación de la ganancia en peso corporal en animales controles y alimentados con dietas hipercalóricas.....	40
12.2. Consumo de alimento, agua y kilocalorías en ratas control y mantenidas con alimento hipercalórico.....	41
12.3. Efecto de las diferentes dietas sobre el peso de la grasa corporal .....	43
12.4. Influencia de la dieta sobre el nivel circulante de: a) glucosa, insulina y glucosa/insulina, b) leptina y leptina/insulina y c) corticosterona y pesos de glándulas adrenales .....	44
12.5. Efecto de dietas hipercalóricas sobre las concentraciones séricas de hormonas del eje tiroideo: TSH, T <sub>3</sub> y T <sub>4</sub> .....	47
12.6. Efectos de la dieta rica en carbohidratos o grasa sobre el nivel de RNA mensajeros en diferentes núcleos hipotálamo NPV, AP, HA, HL y HP después de 3 ó 7 días de consumo.....	48
12.6.1. Cambios en el nivel de RNAm de TRH en NPV, AP, HA, HL y H.....	48
12.6.2. Cambios en el nivel de RNAm de TRH-R1 en el HL, HA y HP.....	50
12.6.3. Cambios en el nivel de RNAm de TRH-R2 en el HL y HP.....	51
12.6.4. Cambios en el nivel de RNAm de PPII en NPV, HL y HP.....	51
13. DISCUSIÓN.....	53
14. CONCLUSIONES.....	65
15. PERSPECTIVAS.....	65
16. REFERENCIAS.....	66
17. ANEXOS.....	74

## 1.- ABREVIATURAS

- ACTH Hormona adrenocorticotropa
- Agrp Proteína relacionada al agoutí
- AP Área preóptica
- ARC Núcleo arcuato
- CART Transcrito regulado por anfetamina y cocaína
- CCK Colecistoquinina
- CRH Hormona liberadora de corticotropina
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- FDA Food and Drug Administration (Agencia de alimentos y medicamentos)
- FSH Hormona foliculoestimulante
- GH Hormona de crecimiento
- HA Hipotálamo anterior
- HL Hipotálamo lateral
- HP Hipotálamo posterior
- HPT Eje hipotálamo pituitaria tiroides
- HT Hormonas tiroideas
- IMC Índice de masa corporal
- LH Hormona luteinizante
- MCH Hormona concentradora de melanina
- NDM Núcleo dorsomedial
- NPV Núcleo paraventricular
- NPY Neuropeptido Y
- NVM Núcleo Ventromedial
- OMS Organización Mundial de la Salud
- PAM Peptidilglicina  $\alpha$ -amida monooxigenasa
- PC Convertasa
- PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PPII Piroglutamil peptidasa II
- POMC Pro-opiomelanocorticotropina
- PRL Prolactina
- RNAm Ácido ribonucleico mensajero
- RT Transcriptasa reversa
- SNC Sistema Nervioso Central
- TRH Hormona liberadora de tirotropina
- TRH-R1 Receptor tipo 1 de la hormona liberadora de tirotropina
- TRH-R2 Receptor tipo 2 de la hormona liberadora de tirotropina
- TSH Hormona estimuladora de tiroides
- T<sub>3</sub> Triyodotironina
- T<sub>4</sub> Tiroxina
- $\alpha$ -MSH  $\alpha$ -Hormona estimuladora de melanocitos



## 2.- RESUMEN

Las causas subyacentes de la obesidad tienen que ver con la regulación anormal de los circuitos cerebrales que controlan el apetito y la saciedad. En el hipotálamo se encuentran elementos sensores de nutrientes, aquí convergen y se integran señales relacionadas con la disponibilidad y gasto de nutrientes. El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) tiene como función principal mantener niveles fisiológicos de las hormonas tiroideas, que modulan el gasto energético y la termogénesis. El factor principal que regula eje HPT es la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que es producida por un grupo de neuronas en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo. Cambios en la homeostasis energética del organismo definen la tasa de síntesis y liberación de la TRH en las neuronas del NPV. Se sabe que la obesidad promueve a largo plazo un aumento en la expresión del RNAm de la TRH en estas neuronas, pero no se sabe la cinética de este cambio, ni si otros circuitos TRHérgicos son regulados al inducir obesidad. Por lo que proponemos que durante el establecimiento de la obesidad, algunos elementos de los sistemas TRHérgicos hipotalámicos puedan adaptarse para mantener la homeostasis energética. Para corroborar esta hipótesis, alimentamos ratas macho de 50-60 días de edad durante 3 ó 7 días con dietas de alto contenido de carbohidratos o grasa; durante éste tiempo se cuantificó la cantidad de alimento y agua consumidos así como el peso corporal de cada animal. Después de tres o siete días cuantificamos algunos indicadores bioquímicos involucrados en el balance energético como la leptina e insulina, además de la corticosterona y los niveles de glucosa en sangre así como los elementos del eje tiroideo: la hormona estimuladora de tiroides o tirotropina (TSH) y las hormonas tiroideas. Se cuantificó el nivel de RNAm de los diferentes elementos del sistema TRHérgico en varios núcleos del hipotálamo como son la TRH y sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 y la PPII (piroglutamil peptidasa II) enzima que degrada a la TRH. Encontramos que las ratas que consumieron la dieta alta en grasa aumentaron significativamente su peso corporal. El efecto de ambas dietas hipercalóricas se observó sobre de grasa parda que aumento después de 3 y 7 días consumo de las dietas; la grasa blanca epididimal sólo aumentó en los

animales que ingirieron dieta alta en grasa por 3 días, mientras que la grasa blanca subcutánea aumentó a los 7 días. El nivel de glucosa en sangre se elevó en el grupo que consumió 7 dieta alta en grasa, la insulina aumentó significativamente a los 3 y 7 días de consumir dietas hipercalóricas, en cambio los niveles de leptina sólo incrementaron en las ratas que consumieron la dieta rica en grasa. La biosíntesis de la TRH en el NPV se modificó a los 3 días de consumo de las dietas hipercalóricas, sin que se afectara significativamente el nivel de TSH y hormonas tiroideas en suero. La expresión del RNAm de la TRH se modificó en forma tejido específica y dependiendo del tipo de dieta. La dieta alta en carbohidratos aumentó el RNAm de la TRH en el área preóptica y el hipotálamo anterior en los grupos de 7 días, mientras que en el hipotálamo lateral este aumento se observó sólo con la dieta alta en grasa después de 7 días de consumo; en el hipotálamo posterior no hubo modificaciones al consumir las dietas hipercalóricas. Encontramos incrementos significativos en el RNAm de TRH-R1 en el hipotálamo lateral a los 7 días de consumo de dieta alta en grasa con respecto al grupo que ingirió dieta alta en carbohidratos. La cuantificación del RNAm de la PPII reveló que al igual que los receptores la respuesta es lenta al compararse con el RNAm de la TRH, ya que sólo se observaron modificaciones a los 7 días de consumo de las dietas hipercalóricas, específicamente en el NPV el RNAm de la PPII se incrementó significativamente en el grupo que ingirió dieta alta en grasa, mientras que en el hipotálamo lateral y posterior se observó un incremento significativo en los animales que consumieron dieta alta en carbohidratos. Nuestros datos sugieren que exponer a los animales a un ambiente obesogénico por corto tiempo activa mecanismos anti-obesidad que se hace evidente al incrementar la grasa parda y el nivel de leptina e insulina en suero; además observamos que el nivel de RNAm de elementos de los sistemas TRHérgicos hipotalámicos se adaptan en forma rápida a cambios en el consumo energético y calidad de la dieta.

### 3.- INTRODUCCIÓN

#### 3.1. DEFINICIÓN DE OBESIDAD EN EL HUMANO

En el humano, la obesidad se define como aumento en el peso y grasa corporal, que se estima con una fórmula que combina el peso en kilogramos dividido entre la estatura en metros al cuadrado, denominado Índice de Masa Corporal (IMC) y desarrollado por el estadístico Adolphe Quetelet; siendo éste indicador el más utilizado para estudios epidemiológicos. En el 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo empleó para hacer una clasificación del grado de obesidad, definiendo los siguientes intervalos: peso normal, IMC 18.5-24.9; sobrepeso, IMC 25-29.9; obeso, IMC 30-34.9; obesidad severa, IMC 35-39.9 y obesidad mórbida, IMC  $\geq 40$ . En la actualidad la obesidad es el quinto factor principal de riesgo de defunción en el mundo, según datos de la OMS, a nivel mundial cada año fallecen por lo menos 2.8 millones de personas adultas como consecuencia del sobrepeso u obesidad, debido a que es una enfermedad colateral a varias de las principales causas de muerte como son la diabetes, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer de mama, entre otras (Kopelman, 2000). En México de acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos de 20 años o más fue de 71.3% (sobrepeso 38.8% y obesidad 32.4%) que representan a 48.6 millones de personas. La prevalencia de la obesidad fue más alta en el sexo femenino (37.5%) que en el masculino (26.9%), al contrario del sobrepeso donde el sexo masculino tuvo una mayor prevalencia (42.6%) que el femenino (35.5%). (ENSANUT, 2012; Barquera *et al.*, 2013a). La obesidad infantil se volvió un problema de salud en México, ya que 4 millones de niños sufren sobrepeso u obesidad encontrándose actualmente en el primer lugar a nivel mundial en este rubro. Esto ha llevado a diversas instituciones en nuestro país a implementar estrategias que permitan revertir este padecimiento, por ejemplo, en las escuelas se ha promovido una disminución en el consumo de bebidas azucaradas y mayor actividad física (Barquera *et al.*, 2010).

La etiología de la obesidad es multifactorial; se caracteriza por un desbalance crónico entre la ingesta y el gasto energético (más calorías consumidas que gastadas), así como asociada a diferentes factores conductuales y ambientales que incrementan el consumo calórico y promueven estilos de vida con bajo gasto energético; además puede existir predisposición genética. Dada la importancia de obtener suficiente energía y nutrientes esenciales para la sobrevivencia de los individuos y las especies, existe un complejo sistema de vías que sensan e integran señales del medio interno y externo para activar efectores que regulen la ingestión de alimento y el gasto energético (Zheng y Berthoud, 2008). Se propone que en la obesidad ocurre por la desregulación de varios sistemas de control del metabolismo. Por ello se han realizado estudios que permitan tener un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares que regulan el balance energético, el hambre y la saciedad.

### 3.2. ESTRATEGIAS PARA COMBATIR LA OBESIDAD.

#### A) Cambios en el estilo de vida

La Secretaría de Salud de México recomienda en el plano individual, que las personas limiten la ingestión energética procedente de alimentos altos en grasa o en carbohidratos, preferentemente consuman raciones pequeñas de fruta, verduras, carne, legumbres, cereales integrales y frutos secos, realicen actividad física diaria, para lograr un equilibrio energético y un peso normal. La industria alimentaria puede desempeñar una función importante en la promoción de una alimentación saludable: reduciendo el contenido de grasa, azúcar y sal en los alimentos elaborados, asegurando que todos los consumidores puedan acceder física y económicamente a alimentos sanos y nutritivos poniendo en práctica una comercialización responsable y asegurando la disponibilidad de los mismos; además apoyando la práctica de actividad física periódica en el lugar de trabajo (Barquera *et al.*, 2013b). Se ha observado que en los casos de obesidad donde el hígado está graso, pequeños cambios en el peso corporal generados por el incremento en la actividad física o la disminución en el consumo de alimentos

hipercalóricos disminuyen la esteatosis del hígado, con lo que estos resultados son muy alentadores (Gómez *et al.*, 2013; Deldin y Lee, 2013).

#### B) Farmacológicas.

En términos de farmacoterapia para combatir la obesidad se desarrollaron fármacos que fueron aprobados por la “Food and Drug Administration” (FDA por sus siglas en inglés) de los Estados Unidos, éstos son: la fentermina (supresor del apetito que estimula señales anorexigénicas en el hipotálamo), la sibutramina (suprime el apetito e incrementa la termogénesis) y el orlistat (un inhibidor de lipasa intestinal que reduce la absorción de grasa). En general se tiene una pérdida de peso corporal del 3 al 5% en un periodo de 6 a 12 meses, pero éstos tratamientos tienen varios efectos secundarios adversos, por ejemplo, la sibutramina incrementa el riesgo de ataques cardiacos y derrames cerebrales (Kennett y Clifton, 2010). Otro fármaco que promueve la disminución de peso es la lorcaserina, un agente agonista del receptor central de serotonina (5-HT<sub>2C</sub>) que actúa sobre neuronas hipotalámicas de proopiomelanocorticotropina (POMC) que tienen actividad anorexigénica (actividad que inhibe la ingestión de alimentos). Se cree que la pérdida de peso es debida a su actividad de agonista con el receptor 5-HT<sub>2C</sub>, reduciendo la ingestión calórica e incrementando la saciedad (Taylor *et al.*, 2013). Además la FDA aprobó un fármaco controlado que combina la fentermina con topiramato (este último podría inhibir la lipogénesis en los adipocitos) que activa los mecanismos de saciedad y la supresión del apetito, sin que se haya esclarecido cual es el efecto anorexigénico específico que genera la pérdida de peso (Cannon y Kumar, 2009, Taylor *et al.*, 2013).

#### C) Vacunas.

La grelina es la única hormona periférica con actividad orexigénica (estimula la ingestión de alimentos): es producida y almacenada por el estómago, disminuye el gasto energético y el catabolismo de grasas. Los efectos orexigénicos de la grelina son mediados principalmente por receptores en el hipotálamo que controlan la homeostasis energética (Barsh y Schwartz, 2002), por

lo que es un blanco potencial para el desarrollo de tratamientos contra la obesidad. A este respecto, se ha tratado de desarrollar una vacuna antigrelina o su forma acilada (acilo-grelina). Al realizar la inmunización con grelina se observó que disminuye la ganancia del peso corporal y la adiposidad en mamíferos. La vacunación contra la grelina combinada con una dieta baja en grasa produce resultados muy alentadores en animales de experimentación (Zorilla *et al.*, 2006). En otro grupo de experimentos, los investigadores neutralizaron a la grelina endógena a través de la vacunación con la grelina acoplada a una cápside del virus tipo Influenza, se reportó que disminuye el peso y la cantidad de grasa sin embargo éstos efectos no se observan en periodos largos, lo que ha llevado a proponer que es necesario potenciar la producción del anticuerpo anti-grelina mediante un adyuvante, sustancias que no se pueden utilizar en humanos, porque pueden generar reacciones adversas (Monteiro, 2011, 2013) o bien encontrar un acoplador del antígeno que genere una respuesta inmune mayor.

#### D) Cirugías.

Los métodos quirúrgicos son los que mejores resultados han mostrado al tratar de reducir el peso y grasa corporal durante el primer año post-cirugía. Uno de éstos métodos es la derivación gástrica (Bypass) que consiste en disminuir y restringir la absorción de nutrientes, en la cirugía se crea un reservorio pequeño por la curvatura menor del estómago separado del resto para conectarlo a una parte del intestino delgado y con ello conseguir una saciedad temprana, además de una mala absorción de los nutrientes. Este procedimiento es una cirugía invasiva, complicada y riesgosa, además se ha visto que en muchos casos es necesario mantener dieta y ejercicio para controlar el peso a largo plazo (DeWald *et al.*, 2006).

#### 4.- ELEMENTOS INVOLUCRADOS EN EL CONTROL DEL CONSUMO DE ALIMENTO Y GASTO ENERGÉTICO.

En general, el sistema nervioso de los vertebrados está dividido anatómicamente en componentes centrales y periféricos: el sistema nervioso central (SNC) comprende al cerebro y la médula espinal y el sistema nervioso periférico que incluye componentes motores y sensoriales (nervios craneales y espinales) (Purves *et al.*, 2004). El hipotálamo una estructura del diencefalo (subdivisión del SNC) localizado debajo del tálamo, es el principal concentrador de elementos sensores de nutrientes, ésta región en conjunto con el control periférico de los órganos del tracto intestinal (estómago, intestino, páncreas e hígado) y el tejido adiposo, entre otros, ayudan al mantenimiento del peso y composición corporal mediante señales nerviosas, hormonas, neuropéptidos, nutrientes y metabolitos (Horvath *et al.*, 2004). El cerebro controla el apetito y la saciedad por medio de actividad neuronal que es modulada por señales químicas que son secretadas dentro de la circulación, es también informado por el tracto gastrointestinal sobre el estado de la homeostasis energética y la ingesta de alimentos a través de señales metabólicas y neuroendocrinas específicas (Berthoud, 2002) (figura 1).

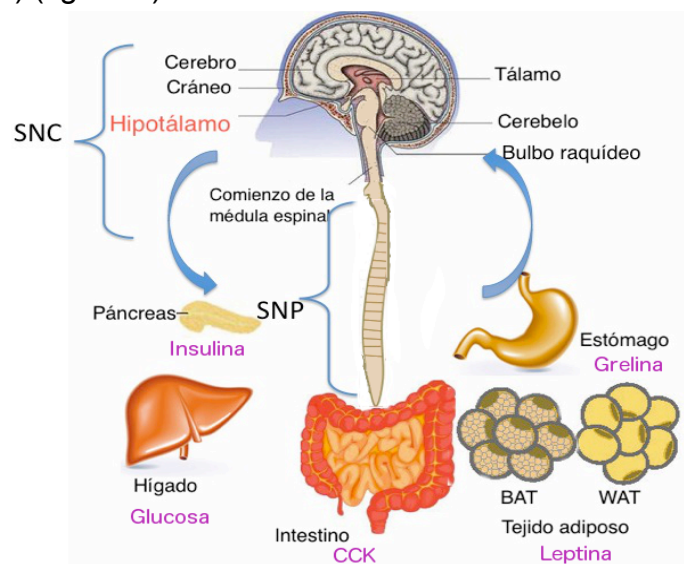


Fig. 1. La comunicación entre el sistema nervioso central y periférico participa en el estado metabólico del organismo. La interacción entre el hipotálamo (SNC), el tracto gastrointestinal (SNP) y el tejido adiposo ésta dada por señales nerviosas, hormonales y neuroendocrinas, la detección hipotalámica de nutrientes activa

neurocircuitos involucrados en la regulación de la ingestión de alimentos, metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa. Señales anorexigénicas como la leptina, la insulina y CCK o señales orexigénicas como la grelina (SNP) interactúan con centros hipotalámicos (SNC) para ejercer sus funciones reguladoras por medio de diferentes vías (vía el nervio vago o por el torrente sanguíneo).

La homeostasis energética o los procesos por los cuales las reservas de energía son mantenidos por largos periodos de tiempo están cuidadosamente controlados. El balance energético es el resultado entre el equilibrio de la ingestión de alimentos y el gasto energético (termogénesis, actividad física y consumo de alimento) los componentes de este balance son regulados por dos sistemas independientes pero interrelacionados: 1) sistema de regulación a corto plazo, que controla la iniciación y terminación de la alimentación dependiendo del contenido del tracto gastrointestinal y 2) sistema a largo plazo, que mantiene las reservas de energía y por lo tanto el peso corporal. Varias hormonas proveen al cerebro información sobre el estado del balance energético. Estas pueden ser divididas en dos categorías: hormonas que son producidas por el tracto gastrointestinal que señalan hambre o saciedad a corto plazo y hormonas que señalizan el estado de reservas de grasa del cuerpo, que son señales a largo plazo (Remmers y Delemarre-van de Waal, 2011).

La leptina es la principal hormona periférica involucrada en la homeostasis energética a largo plazo. En humanos y roedores la leptina es producida por tejido adiposo, en proporción al contenido de grasa corporal. Los efectos centrales de la leptina consisten en reducir la ingestión de alimento e incrementar el gasto energético, inhibe las neuronas que expresan los péptidos orexigénicos y activa a las neuronas que expresan los péptidos anorexigénicos, por lo que controla negativamente la ganancia de peso corporal. Además, la leptina potencia el efecto de la insulina (Myers y Olson, 2012), regula la sensibilidad de esta y también la homeostasis de la glucosa. Esta hormona se consideró la panacea en el control de la obesidad durante varios años, pero estudios posteriores demostraron que puede haber resistencia a la leptina, tanto a nivel de los receptores como al transporte de la hormona a través de la barrera hematoencefálica (Amitani *et al.*, 2013). Otra señal periférica es la insulina la cual es producida por las células  $\beta$  del



páncreas, controla la disponibilidad de glucosa en sangre y en la regulación del balance energético, actúa a corto y largo plazo. La liberación de insulina está relacionada con cambios en los niveles energéticos, ya que después de la ingestión de alimentos esta aumenta rápidamente. Cuando la insulina hace blanco en células del cerebro actúa como señal anorexigénica en centros hipotalámicos para reducir el consumo de alimento y el peso corporal (Wynne *et al.*, 2005). La leptina e insulina son consideradas señales de adiposidad (figura 2).

Existen otras señales periféricas involucradas en la regulación a corto plazo de la iniciación y terminación de la ingesta, estas son producidas en diferentes regiones del tracto gastrointestinal, como son: colecistoquinina (CCK), péptido 1 parecido al glucagon, oxintomodulina, polipéptido pancreático y péptido YY. Principalmente son secretadas después de la alimentación e inhiben la ingestión de alimento; sus acciones sobre el apetito son ejercidas vía el nervio vago, el tallo cerebral y el hipotálamo (Berthoud y Morrison, 2008; Spiegelman y Flier, 2001). La grelina, producida en el estómago, es única entre los péptidos gastrointestinales; su particularidad radica en el papel orexigénico que posee ya que la inyección central o periférica de la grelina estimula la ingestión y además decrece el gasto energético favoreciendo un balance energético positivo; los niveles en sangre de grelina aumentan antes de iniciar el consumo de alimento y comienzan a decrecer con la ingestión (Berthoud y Morrison, 2008; Spiegelman y Flier, 2001; Amatani *et al.*, 2013) (figura 2).

Las moléculas señal antes mencionadas, actúan como mediadores que coordinan la activación de células localizadas en los diferentes núcleos hipotalámicos que participan en la regulación del balance energético. Se demostró que varios núcleos hipotalámicos son críticos para el mantenimiento del peso corporal, decodificando señales neuronales y periféricas (Balthasar, 2009). El papel del hipotálamo en el control del apetito y la saciedad fue determinado al lesionar algunos núcleos específicos; por ejemplo, lesiones en el hipotálamo lateral disminuyen la ingestión de alimento provocando así la pérdida de peso, mientras que lesiones en el núcleo ventromedial incrementan el apetito causando

obesidad. Además, se han identificado diferentes péptidos y/o neurotransmisores, que regulan la temperatura, el consumo de agua, el balance de energía, el sueño y la reproducción, entre otras funciones (Balthasar, 2009; Remmers y Deleamarre-van de Waal, 2011).

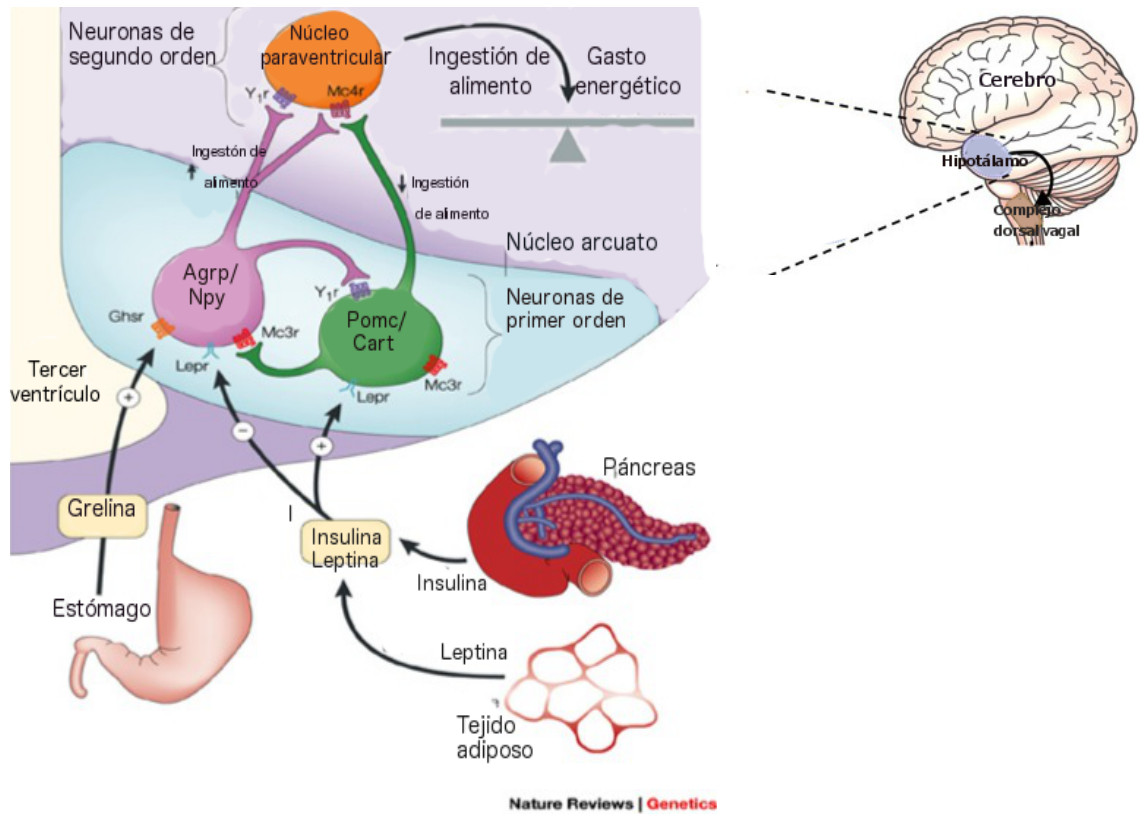


Fig. 2. Control de la homeostasis energética por neuropeptidos hipotalámicos y hormonas circulantes. Neuropeptidos como Agrp/NPY estimulan la ingestión de alimento mientras que POMC/CART la inhiben. Leptina e insulina son hormonas que circulan en proporción al almacen de tejido adiposo; inhiben las neuronas de Agrp/NPY y estimulan a las neuronas de POMC/CART. La grelina secretada del estómago puede estimular Agrp/NPY. Finalmente el núcleo arcuato envía proyecciones neuronales al núcleo paraventricular asociado a funciones neuroendocrinas así como a señales de saciedad. Modificado de Barsh y Schwartz, 2002. Ver indice de abreviaturas.

#### 4.1. HIPOTÁLAMO: CENTRO DE REGULACIÓN HOMEOSTÁTICA DEL METABOLISMO.

El hipotálamo es reconocido como el principal centro de integración y convergencia de señales centrales y periféricas que regulan la homeostasis energética. Contiene dos sistemas efectores: el sistema autonómico que esta constituido por los circuitos de neuronas que regulan las funciones vitales como la temperatura, ritmo cardiaco, ingestión de alimentos (entre otras) y el sistema endocrino que consta de neuronas hipofisiotrópicas que controlan la secreción de hormonas de la hipófisis que permiten la comunicación del cerebro con los órganos periféricos en sentido descendente (Joseph-Bravo y de Gortari, 2007) (figura 3B). Entre los núcleos hipotalámicos (figura 3A) que están implicados en la regulación del balance energético están: el núcleo arcuato (ARC) localizado alrededor y debajo del tercer ventrículo en la base del hipotálamo, contiene neuronas que sintetizan péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY) y al péptido relacionado al Agoutí (AgRP) y neuronas que sintetizan péptidos anorexigénicos como el transcrito regulado por amfetamina y cocaína (CART) y la pro-opiomelanocorticotropina (POMC) del que se deriva otro péptido la hormona estimuladora de melanocitos ( $\alpha$ -MSH); este núcleo contiene receptores para la leptina e insulina (figura 2).

El hipotálamo lateral (HL) es conocido como el centro del hambre, esta formado por neuronas que sintetizan orexinas y hormona concentradora de melanina (MCH) las cuales estimulan la ingestión de alimento. El núcleo ventromedial (NVM) y el núcleo dorsomedial (NDM) contienen receptores para leptina e insulina. El núcleo paraventricular (NPV) sintetiza péptidos anorexigénicos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la hormona liberadora de corticotropina (CHR). Estas regiones hipotalámicas integran y envían señales orexigénicas y anorexigénicas de neuronas específicas para el control de la ingestión alimentaria, existe una comunicación de neuronas del ARC que envían proyecciones al NPV, al HL, al NVM y a neuronas de ( $\alpha$ -MSH) propias del ARC (Berthoud, 2002(a); Spiegelman y Flier, 2001).

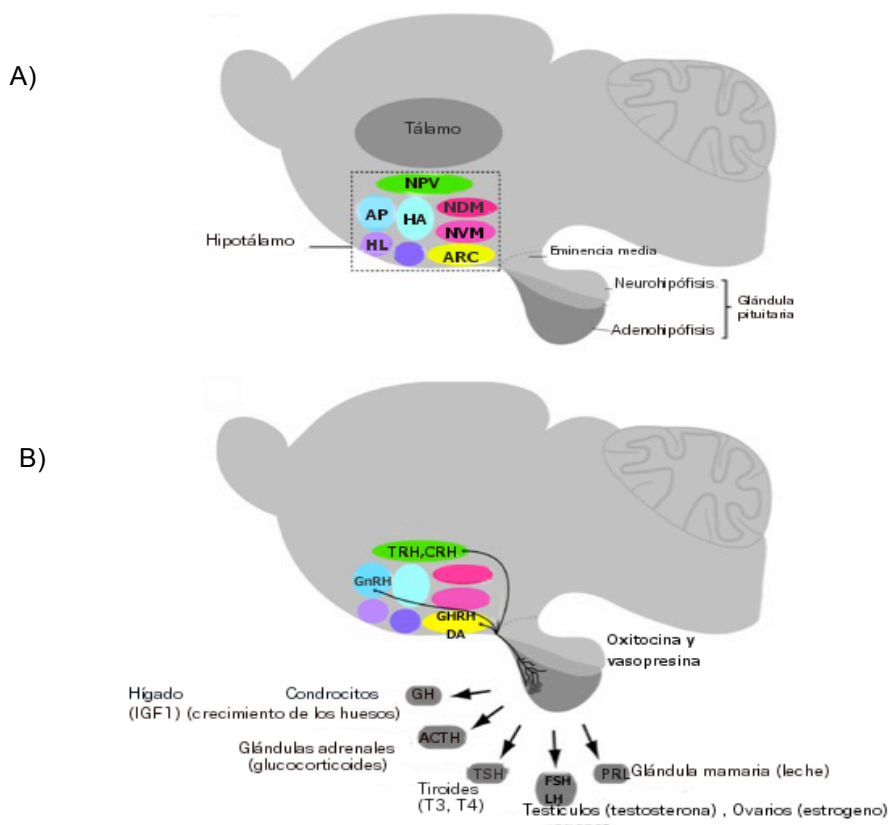


Fig. 3. Ilustración de la organización de los núcleos hipotalámicos. A) Vista lateral de la organización de los núcleos hipotalámicos. El hipotálamo se encuentra debajo del tálamo y en la parte superior del tronco cerebral, esta dividido en distintas regiones que producen neuropéptidos con diversas funciones. El hipotálamo controla a la glándula pituitaria (o hipófisis) que a su vez esta dividida en neurohipófisis y adenohipófisis. B) Estructura general del eje hipotalámico-adehipofisiario y su órganos blanco. El hipotálamo secreta péptidos que mediante el sistema portal (sistema especializado de vasos sanguíneos) modulan la actividad de la adenohipófisis o por liberación de sustancias de la neurohipófisis que son proyecciones nerviosas provenientes del la región magnocelular del hipotálamo. Las hormonas liberadoras hipotalámicas (TRH, CRH, GnRH, etc.) estimulan la síntesis de hormonas estimulantes (ACTH, TSH, GH, etc.) de la adenohipófisis, las cuales viajan por la circulación sanguínea hasta sus órganos blancos y de esta manera controlar diferentes actividades biológicas. Ver índice de abreviaturas.

Condiciones de balance energético negativo como ayuno, lactancia o diabetes dependiente de insulina (diabetes tipo 1), están caracterizadas por hambre, termogénesis reducida y por un decremento en los niveles de leptina e insulina. La disminución en los niveles de dichas hormonas induce la síntesis de NPY (en el ARC y en el NDM) y AgRP (en el ARC). La expresión de NPY se incrementa en condiciones de lactancia y ejercicio; en ambos núcleos las neuronas que expresan al NPY tienen receptores para leptina y son glucosensibles. En el ARC estas neuronas expresan receptores para insulina y en

el NDM para CCK. Niveles altos de glucocorticoides, en circunstancias de ayuno aumentan la liberación de NPY del ARC (Joseph-Bravo y de Gortari, 2007; Blouet y Schwartz, 2010; Fekete *et al.*, 2001).

El NPV es un núcleo importante en la integración de información autonómica y neuroendocrina, está formado por las regiones magnocelular y parvocelular. Las neuronas magnocelulares proyectan hacia la neurohipófisis de donde son liberadas la oxitocina y la vasopresina. La parte ventral de la región parvocelular proyecta a centros autónomos y la parte medial incluye neuronas que sintetizan la CRH, la TRH, vasopresina y CART; además es una de las regiones más densamente invadidas por neuronas de POMC y NPY/AgRP (Lenard y Berthoud, 2008). Parte de estas neuronas denominadas hipofisiotróficas expresan receptores intracelulares de hormonas tiroideas (HT) triiodotironina ( $T_3$ ), tiroxina ( $T_4$ ) y de glucocorticoides; sus axones terminan en la eminencia media, de donde éstas neurohormonas son liberadas al sistema portal hipotálamo-hipófisis por medio del cual llegarán a sus células blanco en la adenohipófisis induciendo la síntesis y liberación de adrenocorticotropina (ACTH), tirotropina (TSH) y prolactina (PRL). La ACTH y TSH a su vez tienen como órganos blanco la corteza adrenal y la glándula tiroides respectivamente, donde controlan la síntesis y liberación de corticosterona y hormonas tiroideas involucradas en la homeostasis energética (Blouet y Schwartz, 2010; Nillni 2010) (figura 3B).

Existen otras áreas del SNC que están involucradas en sensor e integrar señales sobre el estado metabólico del organismo. Se encuentran en particular regiones del sistema límbico que participan en los mecanismos de recompensa y adicción. Se han observado similitudes conductuales entre la dependencia a sustancias y el consumo excesivo de alimento que podrían derivar del mismo desbalance dentro de los circuitos neurales de recompensa que contribuyen en la motivación a consumir ciertas drogas o alimentos. La vía de recompensa de la dopamina es fundamental para desarrollar estas conductas, ya que se libera en actividades placenteras como el uso de drogas, la ingestión alimentos o en las relaciones sexuales (Lee *et al.*, 2012). Varias hormonas y neuropéptidos

involucrados en la homeostasis energética intervienen en la vía de recompensa de la dopamina; por ejemplo las señales orexigénicas incrementan la actividad de neuronas dopaminérgicas en el area ventral tegmental, mientras que las anorexigénicas la inhiben y decrecen su liberación (Volkow *et al.*, 2013). Por lo tanto la decisión de alimentarse o no, está influenciada no sólo por la homeostasis del medio interno, sino que además influyen factores como la palatabilidad y las respuestas condicionadas provocadas por el ambiente.

#### 4.2.- LA TRH Y LA REGULACIÓN DE SU METABOLISMO POR ALTERACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA.

La hormona liberadora de tirotrópina es un tripéptido amidado (piroGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) (figura 4) que originalmente fue aislado y caracterizado en base a su acción como hormona liberadora y estimuladora de la síntesis de tirotrópina y prolactina de la pituitaria (adenohipófisis). La primera acción de la TRH da lugar a la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT) (Hainseleder *et al.*, 1992). Además de su actividad endocrina, se ha propuesto que la TRH tiene funciones biológicas que pueden ser neurales, es decir funciona como neuromodulador en el SNC.

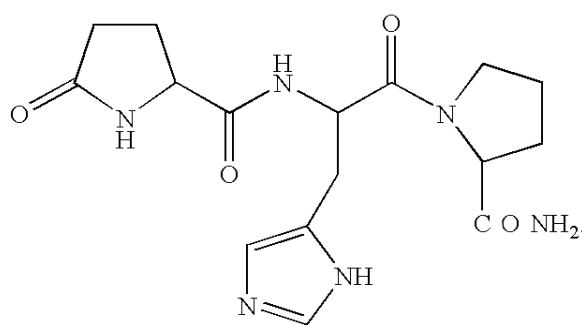


Fig. 4. Estructura de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). El extremo amino teminal poseé un grupo piroglutamil y en el extremo carboxilo un grupo amido.

La biosíntesis de la TRH se lleva a cabo en el NPV. La TRH surge del procesamiento post-traduccional de una larga proteína precursora denominada

pro-TRH mientras es transportado de la red transGolgi para formar parte de gránulos de secreción; estos gránulos maduros se dirigen a los sitios de secreción de la membrana plasmática de la célula. El precursor de TRH es hidrolizado durante su recorrido por el retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas de transporte. Los procesamientos iniciales de corte son llevados a cabo por dos miembros de la familia de pro-hormonas convertasas PC1/3 y secundariamente por PC2 en la red trans-Golgi generando formas intermedias; estas formas intermedias de proTRH son empacadas en vesículas secretoras junto con enzimas proteolíticas que continúan con el procesamiento; los productos resultantes quedan expuestos a modificaciones adicionales por exopeptidasas, incluyendo a la carboxipeptidasa E (CPE) que remueve los aminoácidos básicos del C-terminal (arginina o lisina). La glicina terminal del precursor inmediato de la TRH (gln-his-pro-gly) es entonces modificada por la peptidilglicina alfa-amida monooxigenasa (PAM), dejando un grupo amido en su carboxilo terminal. Finalmente el residuo de glutamina del extremo amino terminal es modificado a un grupo piroglutamil por una ciclización llevada a cabo por la glutaminil ciclasa para dar así a la formación del péptido TRH biológicamente activo (Nillni EA. 2010) (figura 5).

Han sido caracterizados dos tipos de receptores de TRH acoplados a proteínas G: TRH-R1 y TRH-R2, los cuales están diferencialmente distribuidos en el SNC. El RNAm del TRH-R1 está expresado en regiones neuroendocrinas que regulan el eje HPT como son la adenohipófisis y el NPV, también se localiza en otras regiones hipotalámicas como: ARC, hipotálamo anterior, lateral y dorsomedial. Al contrario del RNAm del TRH-R2 que se encuentra en concentraciones moderadas en el hipotálamo lateral, anterior y más limitado en el ventromedial (Heuer *et al.*, 2000) y no se ha detectado en la adenohipófisis. La expresión de los receptores puede ser modulada por el nivel de hormonas tiroideas y la TRH. La TRH puede ser hidrolizada en el espacio sináptico por la piroglutamil peptidasa II (PPII), una ectoenzima específica que hidroliza el enlace peptídico piroglutamil-histidil de la TRH y se expresa en diferentes núcleos hipotalámicos, así como en otras regiones cerebrales y periféricas. En el torrente sanguíneo la TRH también puede ser hidrolizada por la tiroliberinasa una

isoforma de la PPII. La actividad de PPII es regulada por hormonas tiroideas, estrógenos y la TRH (Heuer *et al.*, 2000).

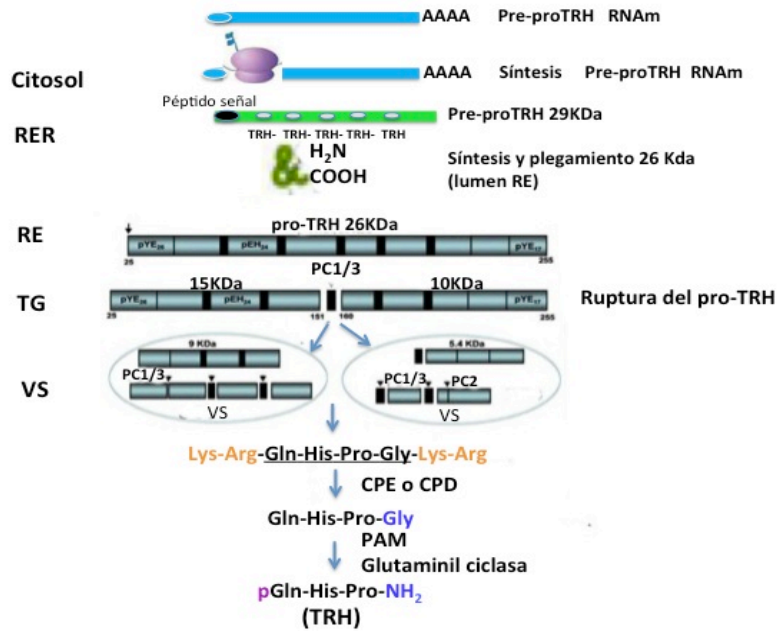


Fig. 5. Esquema de la síntesis y procesamiento de la proteína precursora de la TRH. En las neuronas TRHérgicas del hipotálamo se realiza la transcripción del RNAm del pre-pro TRH, el cuál tiene que viajar del núcleo celular a los ribosomas del RER (Retículo endoplásmico rugoso) para ser traducido, esto dará lugar a la proteína precursora de 29 KDa; el péptido señal permite la translocación al lumen del RE (Retículo endoplásmico) donde se elimina esta secuencia y se convierte en pro-TRH y se dará inicio al procesamiento de este precursor. Al viajar dentro de vesículas secretoras (VS) por la red trans-Golgi (TG) sufre una serie de modificaciones post-traduccionales. La carboxipeptidasa E (CPE) remueve los aminoácidos básicos del C-terminal (arginina o lisina); la glicina terminal del precursor inmediato de la TRH (gln-his-pro-gly) es modificada por la peptidilglicina alfa-amida monooxigenasa (PAM), dejando un grupo amido en su carboxilo terminal. Finalmente el residuo de glutamina del extremo amino terminal es modificado a un grupo piroglutamil por una ciclización llevada a cabo por la glutaminil ciclasa convirtiéndose en el péptido activo de la TRH. Modificado de Nillni, 2010.

Se ha reportado que cambios en el estado energético de los organismos modifican la tasa de síntesis y liberación de la TRH en las neuronas TRHérgicas del NPV. El nivel de RNAm y liberación de la TRH reducidas por ayuno (Lechan y Fekete, 2006), repercute en una disminución en la concentración de hormonas tiroideas circulantes. El efecto en el RNAm de TRH es revertido por la aplicación



de leptina o  $\alpha$ -MSH (Legradi *et al.*, 1997; Fekete *et al.*, 2000a). Recientemente se ha demostrado que en el ayuno hay un incremento en la actividad de la deiodinasa 2 (D2) de los tanicitos del tercer ventriculo, provocando un aumento en el nivel de  $T_3$  local, generando un efecto inhibitorio sobre el nivel de RNAm de TRH en el NPV en esta condición (Copola *et al.*, 2005).

Al igual que en el ayuno, otras condiciones con balance energético negativo como ocurre en los retos inmunológicos, en donde el sistema inmune se activa para combatir la enfermedad o en la lactancia cuando la glándula mamaria se hipertrofia para la producción de la leche, estos procesos requieren un elevado gasto energético para poder desarrollar su función. En ambas condiciones fisiológicas, la biosíntesis de TRH en el NPV se encuentra disminuída (Fekete *et al.*, 2005; van Haansteren *et al.*, 1996; Uribe *et al.*, 1991) así como el nivel de hormonas tiroideas. Recientemente se ha observado que durante el ejercicio voluntario en la rata se genera un balance energético negativo determinado por disminución en la cantidad de grasa blanca y el consumo de alimento, asociado a una disminución en el nivel del RNAm de TRH en el NPV sin cambio en el nivel de hormonas tiroideas circulantes (Ramírez, 2006; Uribe *et al.*, 2014). Todos estos resultados indican que la biosíntesis de TRH en el NPV se inhibe en condiciones de balance energético negativo.

En el tallo cerebral el RNAm de TRH y el de su receptor TRH-R1 se incrementa en el ayuno (Ao *et al.*, 2006), contrario al efecto observado en la TRH en el NPV, estos datos sugieren que la TRH puede tener acciones diferentes sobre el metabolismo energético dependiente de su sitio de acción. A este respecto se ha demostrado que la administración de TRH intracerebroventricular, periférica o directa sobre el hipotálamo medio decrece el consumo de alimento, peso corporal y aumenta la temperatura corporal, mientras que la administración intracisternal de TRH incrementa la ingestión de alimento a través de la estimulación vagal-colinérgica sobre la liberación de grelina del estómago. El efecto orexigénico de la TRH en el tallo cerebral es bloqueado por la aplicación de un antagonista del receptor de grelina, así la dirección del efecto de la TRH sobre

la ingestión depende de la región blanco de TRH y probablemente refleja el tipo de neuronas que lo sintetizan (Guo *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la TRH es un elemento importante en la regulación de la homeostasis energética sin que se haya definido aún claramente cual es su papel y el sito de acción. Por otro lado, las neuronas TRHérgicas del NPV responden a señales provenientes del núcleo arcuato: la biosíntesis de la TRH en estas neuronas es inhibida por la aplicación del neuropéptido Y y AgRP, acciones mediadas por el receptor NPYR-5 para el neuropéptido Y y el receptor MCR4 para el AgRP (Fekete *et al.*, 2002). El efecto contrario se ha observado al aplicar al neuropéptido CART el cuál aumenta el nivel de RNAm de la TRH en el NPV (Fekete *et al.*, 2000).

Se observó que el RNAm de la TRH en el NPV se incrementa en ratas hembras ovariectomizadas; en esta condición hay una disminución en el gasto energético basal y un incremento en el consumo de alimento, por lo que se sugiere que en condiciones de balance energético positivo la biosíntesis del RNAm de TRH se activa. La restitución de estrógenos en estos animales, revierte el aumento en el peso corporal y el nivel de RNAm de TRH del NPV, sin que esta hormona sea la responsable del efecto directo sobre la biosíntesis, dado que éstas neuronas no expresan a los receptores de estrógenos (Uribe *et al.*, 2009). Cambios en el nivel circulante de hormonas tiroideas y corticosterona afectan el sistema TRHérgico: en particular se ha demostrado que la T<sub>3</sub> ejerce un efecto negativo directo sobre la síntesis del RNAm de TRH en el NPV y el tallo cerebral, mientras que la eliminación de la corticosterona circulante induce un aumento en el nivel de RNAm de TRH del NPV (Segerson *et al.*, 1987; Kackuska *et al.*, 1995; Lechan y Fekete, 2006).

## 5.- EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-TIROIDES (HPT) Y LA OBESIDAD.

La TRH del NPV induce la síntesis y liberación de tirotrópina (TSH) en la adenohipófisis quien a su vez, al llegar a la tiroides activa la síntesis y liberación de hormonas tiroideas triiodotironina (T<sub>3</sub>) y tiroxina (T<sub>4</sub>). El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (figura 6) mantiene un nivel constante de hormonas tiroideas (HT) libres en el torrente sanguíneo por un sistema de retroalimentación negativa: cuando la concentración de HT aumenta se inhibe la síntesis de TSH en la adenohipófisis y también disminuye la síntesis y liberación de TRH en el NPV; en cambio cuando los niveles de HT disminuyen la biosíntesis y secreción de TRH y TSH aumentan; estos cambios en los niveles de HT se asocian con cambios en el peso corporal y el gasto energético, debido a que las HT son responsables del gasto de energía en reposo entre otras funciones (Nillni, 2010). La regulación del eje HPT puede ocurrir a diferentes niveles: en la síntesis y liberación de la TRH y TSH así como en la síntesis de T<sub>4</sub> y su conversión a T<sub>3</sub>. Recientemente se ha demostrado que hay conversión local de HT en los tanicitos del tercer ventriculo y que participan en la regulación negativa de la biosíntesis de TRH en el NPV del hipotálamo (Sánchez *et al.*, 2009).

En humanos y animales el eje esta finamente regulado, adaptándose a cambios en las necesidades energéticas como se mencionó anteriormente. Experimentos conducidos *in vivo* demostraron que en ratas macho con obesidad inducida por dieta alta en grasa durante 2 ó 3 meses, se incrementan los niveles del RNAm de la TRH, del péptido TRH y de la señalización por STAT 3 en neuronas TRHérgicas del NPV, en correlación con un incremento en el nivel circulante de leptina. Similar a lo que ocurre con el ayuno, las hormonas tiroideas circulantes no parecen ser un componente determinante en mantener fijo el nivel de RNAm de la TRH en el NPV en ratas con obesidad inducida, ya que los niveles circulantes de HT no tienen cambios consistentes y que la actividad de la D2 (enzima involucrada en el mecanismo de producción de T<sub>3</sub> en la eminencia media) tampoco cambia (Araujo *et al.*, 2010; Perello *et al.*, 2010).

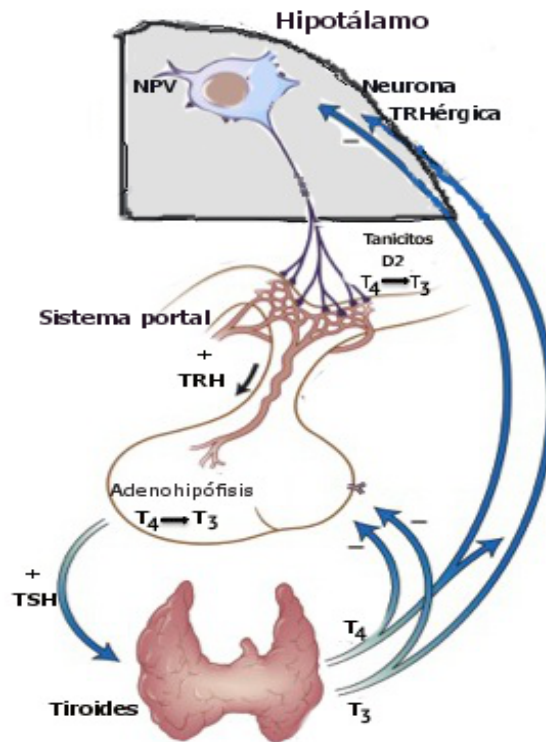


Fig. 6. Representación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT). La TRH se sintetiza en las neuronas TRHérgicas del NPV y estas neuronas proyectan sus terminales nerviosas a la eminencia media donde liberan al péptido en el sistema portal hipofisiario, alcanzando a sus células blanco en la adenohipófisis, es aquí donde se estimula la síntesis y liberación de TSH y PRL que a su vez, viajan por medio de la sangre a sus órganos blanco, tiroides y glándulas mamarias respectivamente. En la tiroides se sintetizan y liberan a las HT (T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>); estas hormonas ejercen un efecto retroalimentador negativo sobre la actividad del eje tiroideo.

En otros experimentos, se ha analizado que la acción directa de la leptina sobre las neuronas de TRH está involucrada en el incremento de la presión arterial; ya que en este estudio se utilizó un modelo de hipertensión inducida por obesidad que a su vez fue producida por el consumo de dieta alta en grasa, se observaron niveles altos de leptina y un incremento en los niveles de TRH diencéfala, estos resultados fueron asociados al incremento en la presión arterial, ya que al bloquear la expresión de prepro-TRH la hipertensión disminuyó (Landa *et al.*, 2007). A este respecto, también se ha visto que la inyección de oligonucleótidos antisentido al mensajero de la TRH en el ventrículo lateral y área preóptica, revierte el incremento de la presión arterial en las ratas obesas (García *et al.*, 2005).

Además, en dos modelos de ratones obesos se estudió la expresión de la TRH diencefálica y su papel entre la asociación de la leptina y la presión arterial ya que la TRH puede ser utilizada como mediador; se observó que los ratones *ob/ob* (carentes de leptina funcional circulante) tuvieron presión arterial baja y niveles bajos en el contenido de TRH diencefálica, mientras que en los ratones *agouti-amarillos* (hiperleptinémicos e hipertensos) presentaron niveles altos en el contenido de la TRH y la presión arterial; también se observó que la inyección subcutánea de la leptina en ratones *ob/ob* incrementó la presión arterial y el nivel de TRH diencefálica; estos cambios correlacionan muy bien con la concentración sérica de leptina y con el modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa en donde se observó un peso corporal elevado acompañado por hiperleptinemia, niveles elevados de la TRH diencefálica e hipertensión, estos cambios pueden ser revertidos suprimiendo la expresión de prepro-TRH, sugiriendo que la TRH podría mediar los efectos de la leptina no solo en la regulación del balance energético sino también en la hipertensión. Debido a que las mediciones fueron realizadas en todo el hipotálamo, cabe la posibilidad de que los cambios de la TRH en estas dos cepas de ratones no ocurran en un solo núcleo hipotalámico sino en varios de ellos (Burgueño *et al.*, 2007).

## 6.- MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR LA OBESIDAD.

### 6.1.- Animales obesos generados por alteraciones genéticas.

Los estudios más importantes en la identificación del sistema que controla el peso corporal provienen del estudio en ratones con obesidad determinada genéticamente, existe una gran variedad de modelos sin embargo sólo mencionaremos algunos.

Se han descrito mutaciones que afectan un solo gen y dan como resultado un fenotipo obeso; existen distintos roedores y no roedores que han sido ampliamente utilizados como modelos para estudiar la obesidad. Uno de estos modelos son los ratones *ob/ob* deficientes de leptina, que como ya hemos mencionado la leptina tiene un papel importante en el control del apetito, estos ratones muestran hiperfagia (ingerir alimento en exceso), obesidad severa y diabetes tipo 2 (Ingalls *et al.*, 1950). Otra mutación conocida es la del gen que codifica para el receptor de leptina *db*, los ratones *db/db* tienen un fenotipo idéntico a los ratones *ob/ob* debido a un daño durante la señalización de leptina en el hipotálamo. Mutaciones en el gen *agouti* como la sobreexpresión de la proteína *agouti*, también muestran un fenotipo de obesidad, hiperleptinemia, diabetes tipo 2 y pelaje amarillo, se vio que la sobreexpresión específica en el tejido adiposo incrementó el tamaño de éste, se sugiere que el papel obesigénico es dependiente del tejido. Además han sido utilizados modelos de obesidad en ratas, entre las que están: las *zucker fatty rat* (ZFR, por sus siglas en inglés) las cuales presentan una mutación recesiva en el gen *fatty* (*fa*) que codifica para el receptor de leptina, estas ratas son caracterizadas por hiperfagia y obesidad temprana la cual aparece a las 5 semanas de edad como una acumulación de grasa subcutánea. También se reportó que la transferencia del gen *fa* a ratas *wistar* (*wistar fatty rat*) hizo que desarrollaran enfermedades relacionadas a obesidad como diabetes tipo 2, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Kanasaki y Koya, 2011).

## 6.2.- Animales obesos obtenidos por alimentación con dietas hipercalóricas.

En los años cincuentas se utilizó por primera vez una “dieta alta en grasa” para inducir obesidad (Masek y Fabry, 1959) en animales experimentales. Desde entonces numerosos protocolos han sido publicados en los cuales ratas o ratones tienen un libre acceso a dietas altas en grasa por distintos periodos de tiempo; los animales expuestos a este tipo de dietas han mostrado ganancia de peso corporal incrementando principalmente su grasa corporal. Las metodologías utilizadas son diversas, desde utilizar dietas altas en grasa disponibles comercialmente o dietas

tipo cafetería como galletas con chocolate o cacahuates. Aunque estos animales típicamente no desarrollan diabetes, muestran resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa, niveles de leptina elevados en plasma y frecuentemente concentraciones séricas de colesterol y triglicéridos elevadas, comparados con los grupos alimentados con dieta estándar (Vickers *et al.*, 2011; Kanasaki y Koya, 2011). Las dietas altas en carbohidratos podrían ayudar a incrementar la sensibilidad de insulina y controlar el nivel de glucosa en sangre, sin embargo la absorción de grasa de las dietas altas en grasa puede afectar la respuesta de la insulina y con ello el control de glucosa.

El modelo de ratas con obesidad inducida por dieta ha sido particularmente provechoso por compartir características con la obesidad en humanos y a diferencia de las condiciones humanas permite la investigación amplia de los efectos de las diferentes dietas, además de proporcionar estrategias que permitan conocer y desarrollar agentes antiobesidad. Estos modelos de animales pueden darnos una aproximación sobre los mecanismos de regulación alterados durante el establecimiento de la obesidad, sin que sea necesario provocar una alteración genética. Por otro lado, el uso de animales con mutaciones genéticas nos permite comprender los mecanismos, componentes y las vías de señalización implicadas en el balance energético y que pudieran estar alteradas en animales que ya han desarrollado la obesidad.

## 7.- JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una de las afecciones con mayor prevalencia a nivel mundial pues ocasiona una disminución en la esperanza de vida debido a sus consecuencias mortales. Se sabe que la edad y el sexo de los animales afectan sus necesidades energéticas y la respuesta del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides, por ello decidimos utilizar ratas macho adultas con el fin de evitar cambios hormonales debido al ciclo estral o a la etapa de crecimiento, además de minimizar cualquier factor de estrés o cambios debidos a la distribución de grasa corporal, ya que nuestro interés es sólo identificar si existen cambios al inicio del consumo de una dieta alta en grasa con respecto a dietas control. Los datos descritos hasta la fecha indican que cuando se establece una obesidad inducida por dieta alta en grasa (2-3 meses) en la rata el eje tiroideo se activa. Sin embargo, se desconoce la velocidad a la cual se observa este cambio, que es un dato importante para entender los mecanismos implicados en el desarrollo de la obesidad. Por lo que es importante conocer qué modificaciones neuroendocrinas y hormonales se presentan al comenzar la ingestión de una dieta rica en grasa (después de 3 y 7 días de consumo). Además, no se ha explorado la posibilidad de que otras neuronas TRHérgicas hipotalámicas se vean alteradas durante la obesidad consecuente del consumo de dietas hipercalóricas.

## 8.- HIPÓTESIS

Sabemos que la TRH tiene un papel importante en el control de la homeostasis energética, por lo que se propone que durante el establecimiento de la obesidad se modificarán los sistemas TRHérgicos hipotalámicos para adaptar el balance energético a esta nueva condición. Suponemos que la expresión del RNAm de la TRH podría incrementar en el núcleo paraventricular, ya que este aumento se ha observado en condiciones de balance energético positivo. Sin embargo, se desconoce si esto sucede para todos lo elementos y que en que otros núcleos hipotalámicos.



## 9.- OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal de este proyecto, es definir si los elementos del sistema TRHérgico (el RNAm de la TRH, de sus receptores y de la PPII) de ratas macho adultas se afectan después de consumir por 3 ó 7 días una dieta rica en grasa. Así como identificar cuáles son las neuronas TRHérgicas del hipotálamo cuya actividad se modula durante el desarrollo de la obesidad.

### 9.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

A) Identificar si hubo cambios en el nivel de RNAm de TRH, TRH- R1, TRH- R2 y PPII en los diferentes núcleos hipotalámicos (NPV, HA, HP, HL y AP) en ratas alimentadas con dietas hipercalóricas por 3 y 7 días.

B) Definir si las concentraciones séricas de las hormonas del eje tiroideo así como de leptina, insulina, corticosterona y el nivel de glucosa en sangre se afectan después de 3 ó 7 días de consumo de alimento rico en grasa o en carbohidratos.

C) Determinar el efecto del consumo de las dietas hipercalóricas (dieta alta en grasa o en carbohidratos) sobre el peso corporal, la ingesta de alimento y agua, así como el nivel de grasa blanca y parda durante 3 ó 7 días en ratas macho adultas.

## 10.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 10.1.- Protocolo experimental para inducir obesidad en la rata macho Wistar.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 2 meses de edad que fueron crecidas en el bioterio del Instituto de Biotecnología, estas fueron mantenidas con ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y alimentadas con dieta estándar (3.1 Kcal/g, 2010SX Teklad global diet-Harlan). A los 45 días de edad, los animales fueron trasladados al área de experimentación donde continuaron en condiciones similares a las salas de reproducción; de 3 a 5 días antes de iniciar el experimento los animales fueron pesados y colocados en grupos de dos por cada caja, sólo se agruparon ratas que tenían un peso inicial similar. Esto nos permitió tener 6 animales por grupo con un triplicado en la determinación de consumo de alimento y agua. Las dietas hipercalóricas fueron adquiridas de la Compañía Harlan de donde se obtiene el alimento regular. Se emplearon tres grupos experimentales que fueron alimentados con dietas diferentes: 1) tres cajas con dieta estándar 2018SX Teklad Global diet 3.1 Kcal/g (24% proteína, 18% grasa, 58% carbohidratos), 2) tres cajas con dieta rica en carbohidratos 3.7 Kcal/g (18.6% proteína, 10% grasa, 69.8% carbohidratos; TD 06416 Teklad custom research diet-Harlan) y 3) tres cajas con dieta alta en grasa 4.6 Kcal/g (19% proteína, 45% grasa, 36.2% carbohidratos; TD 06415 Teklad custom research diet-Harlan); los componentes en la fórmula de las dietas alta en grasa y carbohidratos son los mismos. En total 18 animales fueron mantenidos con este régimen alimenticio durante 3 ó 7 días. Iniciado el experimento se determinó cada tercer día el peso corporal, el consumo de alimento y agua. Después de 3 ó 7 días los animales fueron sacrificados por decapitación. Se colectó sangre del tronco para la obtención de suero en el cual determinamos el nivel de glucosa y hormonas como: tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ), tirotropina, corticosterona, leptina e insulina. Los cerebros fueron removidos del cráneo y congelados inmediatamente en hielo seco y posteriormente se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su disección para obtener los diferentes núcleos hipotalámicos. Al momento del sacrificio se removió la grasa parda escapular y la grasa blanca peritoneal (abdominal, escapular y epididimal)

así como las glándulas adrenales; estos tejidos fueron pesados en una balanza granataria y posteriormente desechados.

#### 10.2.- Disección de cerebros

La disección de los núcleos hipotalámicos se realizó manualmente en los cerebros congelados. Los cerebros se colocaron sobre una caja de Petri a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l de agua estéril; se obtuvieron varios cortes coronales de 0.5 a 1 mm de grosor del hipotálamo con una navaja tipo Gillette, tomando como referencia el atlas de Palkovits y Brownstein, 1986. Los cortes fueron colocados sobre una caja de Petri que contenía hielo seco pulverizado, lo que permitió mantener el tejido congelado. Cada núcleo de interés se extrajo empleando microsacabocados con distintos diámetros interiores. Los tejidos de los núcleos hipotalámicos se guardaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 y 2 ml para su posterior procesamiento. Disectamos: el núcleo paraventricular, el hipotálamo anterior, el hipotálamo lateral, el hipotálamo posterior así como el área preóptica (ver diagrama en anexo 1).

#### 10.3.- Purificación y cuantificación del RNA total de el hipotálamo anterior, posterior, lateral y el núcleo paraventricular.

Durante todo el proceso de purificación de RNA total es importante hacerlo en condiciones libres de RNAsas, para lo cual todo el material de vidrio fue horneado a 180 °C y el material de plástico utilizado fue nuevo y estéril. Todo el material que no pudo ser horneado se descontaminó con RNase ZAP (Ambion), posteriormente se lavó con agua desionizada grado Milli Q, se secó y se esterilizó. El agua empleada en todo el proceso y la preparación de soluciones fue desionizada grado milli Q filtrada por 0.2  $\mu$ m y tratada con dietil pirocarbonato 0.1% con agitación toda la noche y esterilizada dos veces para eliminar el dietil pirocarbonato. El vástago del sonicador se lavó con RNase Zap, después con

agua libre de RNAsa, etanol absoluto y nuevamente con agua libre de RNAsas. Adicionalmente el vástago se lavó con agua libre de RNAsas entre la sonicación de una muestra y la siguiente.

Para la extracción de RNA total se utilizó el método de tiocianato de guanidina, modificado de Chomczynski y Sacky, 1987. Se purificó el RNAm del NPV, HL, HP, HA y AP. Estos núcleos fueron homogenizados y sonicados con 200µl de una solución que rompe la membrana celular, desnaturaliza las proteínas e inactiva a las RNAsas; esta se denomina solución D (Tiocianato de guanidina 4M, citrato sódico 25 mM pH 7.0, N-laurilsarcosina 0.5%, 2-βmercaptoetanol 0.1M); se agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 2M pH 4.0 y se dejó reposar 10 minutos en hielo; se adicionó 1 volumen de fenol saturado en agua libre de RNAsas y 1/2 del volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1), después de agregar cada una de las soluciones se mezcló perfectamente el homogenado empleando un agitador tipo vortex; con esta etapa se eliminaron las proteínas de la preparación. Para separar la fase orgánica de la acuosa, los tubos se centrifugaron a 12000 rpm (Jouan MR, rotor 60 mm de Ø) por 15 min a 4° C, la fase acuosa se colocó en otro tubo y se agregó nuevamente 1 volumen de fenol y ½ volumen de cloroformo:alcohol isoamílico; se obtuvo la fase acuosa y se le agregó 1 volumen de isopropanol. Los tubos se mantuvieron durante 3 horas a -70°C; pasado este tiempo se recuperó el RNA total centrifugando a 14500 rpm (Jouan MR, rotor 60 mm de Ø) por 30 minutos. La pastilla se secó y se resuspendió en la mitad volumen inicial (125 µl) de solución D y se precipitó nuevamente con 1 volumen (125 µl) de isopropanol. Se mantuvo nuevamente 3 horas a -70 °C. El RNA se recuperó por centrifugación como se describió anteriormente; la pastilla se lavó tres veces con etanol al 75% para eliminar las sales, se dejó secar al aire, se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNAsas. Se calentó a 65 °C durante 5 minutos, se mezcló con vórtex y se dejó en hielo. De cada muestra tomamos 1.5 µl por duplicado para determinar la cantidad de RNA total obtenido. La concentración de RNA fue determinada por espectrofotometría a 260 nm con la relación de 1OD= 40 µg/ml, determinándose también la

absorbancia a 230 y 280 nm y sólo fueron utilizadas las muestras con una relación de absorbancia 260/230 y 260/280 arriba de 1.5. La calidad del RNA total fue analizada por electroforesis en gel desnaturalizante, 0.3 µg de RNA total fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y formaldehído 2.2 M. La muestra fue desnaturalizada por 15 minutos a 65°C en formaldehído 2.2 M pH 7.0, fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y formamida al 50%. La calidad de la muestra se determinó por la relación de intensidad de las bandas de RNA ribosomales 28S y 16S.

10.4.- Cuantificación de la presencia de los RNA mensajeros específicos (TRH, TRH-R1, TRH-R2, PPII) por PCR en diferentes regiones del hipotálamo.

Para la cuantificación de la presencia de los RNA mensajeros específicos, realizamos una reacción de síntesis de cDNA con transcriptasa reversa utilizando 1 µg de RNA total previamente desnaturalizado por 5 min a 65 °C, éste se incubó durante 2 horas a 37 °C con 100 unidades de transcriptasa reversa (RT, invitrogen), 6 µl buffer de transcripción 5X, 3 µl de DTT (ditiotreitól, inhibidor de RNAsas) (0.1 M), 1 µl de oligo dT (cebador con base timina) (0.5 µg/ml), 0.6 µl de dNTPs (desoxiribonucleótidos trifosfatados) 10mM; la mezcla de reacción se ajustó con agua libre de RNAsas en un volumen final de 30 µl. Al finalizar el tiempo de incubación se hicieron alícuotas de cDNA de diferente volumen dependiendo del RNA mensajero a ser cuantificado y la región hipotalámica, las alícuotas se mantuvieron en congelación a -20 °C. La determinación del nivel de RNAm específico en cada región se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final (esta reacción es semicuantitativa). La mezcla de reacción se preparó con el cDNA correspondiente para cada gene en base a las pruebas que realizamos en el laboratorio (anexo 2, tabla 2), 5 µl de buffer 10X (Tris.HCl 75 mM pH 9.0, KCl 50mM), 2.5 µl de MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 1 µl de oligonucleótido sentido y antisentido (25 pmoles/µl) (anexo 2, tabla 1 de

secuencias), 1  $\mu$ l de dNTPs (10mM) y 0.5  $\mu$ l de enzima Taq polimerasa (5U/ml) ajustado con agua milli Q a un volumen final de 50  $\mu$ l. También se cuantificó el RNA mensajero de ciclofilina como control interno; para la semicuantificación de éste RNAm se emplearon las mismas condiciones antes mencionadas excepto por la concentración de oligonucleótidos que fue ajustada a 50 pmoles de cada oligonucleótido. Los productos de PCR tanto de RNA mensajeros específicos como del control fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2%; el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.6 mg/ml); se cuantificó la densidad de las bandas de los DNA amplificados utilizando un fotodocumentador y el programa Quantity one® de BioRad. Los resultados son expresados como el cociente entre la intensidad del DNA amplificado a partir de los RNA mensajeros específicos y la intensidad de la banda del DNA amplificado a partir del RNA mensajero de ciclofilina.

#### 10.5.- Determinación del nivel de leptina en suero mediante el ensayo de ELISA.

La determinación de leptina en suero de rata se realizó con el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA por sus siglas en ingles), con el estuche "Rat Leptin ELISA Kit" Cat 90040, Crystal Chem, INC. La determinación se realizó en placas de ELISA de 96 pozos que están cubiertos con el anticuerpo anti-leptina, a cada pozo se le agregaron 45  $\mu$ l del buffer diluyente de la muestra (proporcionado por el Kit), 2.5  $\mu$ l de la muestra o 5  $\mu$ l de los estándares de la curva (0,0.2,0.4,0.8,1.6,3.2,6.4,12.8 ng/ml), se adicionaron 50  $\mu$ l de anticuerpo anti-leptina de ratón desarrollado en cuyo y se incubó por 16 a 20 horas a 4°C. Transcurrido el periodo de incubación, los pozos fueron lavados con la solución de lavado proporcionada por el Kit y se agregaron 100  $\mu$ l de anticuerpo anti IgG de cuyo acoplado a peroxidasa de rábano (POD) y se incubó por 3 horas a 4°C. Posteriormente, se realizaron varios lavados con solución de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo e inmediatamente después se adicionaron 100  $\mu$ l de la solución del sustrato (3,3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB)) de la enzima y la

reacción de color fue desarrollada en la oscuridad por 30 minutos; transcurrido este tiempo la reacción se detuvo con 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1N. La concentración de leptina en las muestras se calculó usando la curva estándar y los valores de absorbancia ( $A_{450}-A_{630}$ ). El coeficiente de variación intra e inter ensayo fue menor al 10% (por lo que se considera útil). Para cuantificar la absorbancia se empleó el lector de ELISA MultiscanFC, Thermo Scientific.

#### 10.6.- Determinación del nivel de Insulina en suero mediante el ensayo de ELISA.

En la determinación de insulina se empleó un kit ultrasensible (Cat 90060, Crystal Chem, INC). La determinación se realizó en placas de 96 pozos que están cubiertas con el anticuerpo anti-insulina. A cada pozo se le agregaron 95  $\mu$ l de diluyente de la muestra proporcionado por el Kit, 5  $\mu$ l de la muestra o de los estándares de insulina (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 ng/ml para realizar la curva estándar). Se incubó por 2 horas a 4°C. Después se lava con solución de lavado (proporcionada por el Kit) para eliminar el exceso de hormona que no se pegó al pozo, se adicionaron 100  $\mu$ l de anticuerpo antiinsulina acoplado a POD; se incubó nuevamente por 30 minutos a temperatura ambiente (T<sup>°</sup>A). Para remover el exceso de anticuerpo se lavó varias veces y se agregaron 100  $\mu$ l del sustrato de la enzima (3,3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB)) y se incubó a TA en la oscuridad por 40 minutos para desarrollar el color; transcurrido este tiempo la reacción se detuvo con 100  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1N y 30 minutos después se determinó la absorbancia a 450 nm y se le sustrajo el valor de absorbancia obtenida a 630 nm en un lector de absorbancia en placa. Para el cálculo de la concentración de insulina en la muestra, se empleó el valor que se obtiene de la resta del valor absorbancia obtenida a 450 nm menos el obtenido a 630 nm, éste se utiliza para interpolar en la curva estándar revelada durante el ensayo. El coeficiente de variación intra e inter ensayo fue menor a 10%.

10.7.- Cuantificación por radioinmunoensayo (RIA) de corticosterona (B), tirotropina (TSH), triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) en suero.

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en una reacción antígeno (Ag)-anticuerpo (Ac), en la que se establece una competencia entre las moléculas del Ag a cuantificar presente en las muestras y las moléculas de ese mismo Ag marcadas con un isótopo radiactivo, por unirse a un Ac específico. La descripción de la preparación de cada ensayo esta en el anexo 3, tabla 3.

En cada uno de los ensayos se determinaron los siguientes parámetros: cuentas por minuto (cpm) totales (T), unión no específica (en ausencia de primer anticuerpo; NSB) y unión en ausencia de la hormona fría (B0). Para la TSH, se preparó una curva estándar por triplicado que consistió en 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de TSH estándar en 200  $\mu$ l de amortiguador RIA (amortiguador de fosfatos 50 mM + EDTA 50 mM + BSA 1%; pH 7.5). Para la corticosterona se utilizaron 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de corticosterona estándar en estándar en 500  $\mu$ l de amortiguador diluyente de esteroides (amortiguador de fosfatos 10 mM + cloruro de sodio 150 mM + gelatina 0.1 %; pH 7.5). Para la T<sub>3</sub> la curva consistió de 20, 50, 100, 200 y 600 ng/dl en 100  $\mu$ l de amortiguador de RIA para T<sub>3</sub> (Kit Coat-A-Count T3 total de Diagnostic Products Corporation –DPC-); para T<sub>4</sub> fueron 1, 4 10 16 y 24 ug/dl en 25  $\mu$ l de amortiguador de RIA para T<sub>4</sub> (Kit Coat-A-Count T4 total de DPC) (ver anexo 3, tabla 2). Todas las muestras se cuantificaron por duplicado. En las muestras de TSH, después de añadir el anticuerpo, se incubaron a TA por 24 horas, después se adicionó la hormona marcada (<sup>125</sup>I-TSH) y se incubaron de nuevo a TA por 24 horas más. Posteriormente, el complejo antígeno/anticuerpo se precipitó agregando 1ml de etanol absoluto frío más 100  $\mu$ l de anticuerpo IgG al 2.5%, 100  $\mu$ l de suero normal de conejo al 2% y 1ml de polietilenglicol 4%; las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 30 minutos. Para las muestras de corticosterona, después de añadir el anticuerpo, se adicionó la hormona marcada (corticosterona tritiada; B-H<sup>3</sup>) se incubaron de 36 a 48 horas a 4°C. Pasado el tiempo de incubación se añadieron 200  $\mu$ l de carbón dextrán y las muestras se centrifugaron



a 5000 rpm por 30 minutos. En las muestras de T<sub>3</sub> se colocaron 100 µl de las muestras sin diluir; se agregaron 100 µl de la hormona marcada (<sup>125</sup>I-T<sub>3</sub>) y se agitaron; el tiempo de incubación fue de 2 horas a 37 °C. Para la T<sub>4</sub> se adicionaron 25 µl de las muestras sin diluir; se agregaron 100 µl de la hormona marcada (<sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>) y se agitaron; se incubaron por 1 hora a 37 °C. Las muestras de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> se incuban a 37 °C en baño de agua. Por último se aspiró el sobrenadante de TSH y corticosterona; para T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> los tubos sólo se decantaron. El complejo antígeno-anticuerpo precipitado se cuantificó en un contador gamma (Gama Minigamma 1275, marca LKB-Wallac) para TSH, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>; para la corticosterona se utilizaron tubos para conteo de radiaciones β (contador beta LS-60001C, Beckman) usando liquido de centello Ecolite (M P Biomedicals). Los valores de las cpm obtenidos de la curva y las muestras se transforman con el software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log para calcular la concentración de hormona de cada una de las muestras.

#### 10.8.- Determinación de glucosa en suero por método Electroquímico.

La determinación de la concentración de glucosa en suero se realizó empleando el equipo Biochemistry Analyzer YSI 2700 SELECT equipado con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada entre dos membranas (una de policarbonato y otra de acetato de celulosa). Este aparato cuenta con un sensor enzimático YSI's (membrana) que cataliza varias reacciones que producen peróxido de hidrógeno; esta molécula es electroquímicamente oxidada en el ánodo de platino de la sonda electroquímica la cual produce una señal eléctrica. La corriente resultante es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. Para detectar la glucosa, la enzima glucosa oxidasa oxida a la glucosa que viene en la muestra generando peróxido de hidrógeno y D-Glucona-δ-lactona como productos finales de la reacción. El rango lineal de la reacción es de 1 a 9.0 g/L de glucosa o dextrosa. El aparato analiza 10 µl de la muestra de suero.

## 11.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se muestran como el promedio  $\pm$  el error estándar (ESM); se analizaron mediante ANOVA multifactorial y se consideró significativa con una  $p < 0.05$ . Para definir la diferencia significativa entre los grupos se empleó el método de comparaciones múltiples de Duncan. En el análisis de los datos de peso corporal y consumo de alimento por día se utilizó el análisis de varianza muestras repetidas (anova de dos vías) y para la comparación entre los diferentes tiempos la prueba de poshoc de Fisher. El programa estadístico empleado fue Super ANOVA ABACUS Concepts, 1984, Berkeley, CA.

## 12.- RESULTADOS

12.1. Determinación de la ganancia en peso corporal en animales controles y alimentados con dietas hipercalóricas.

En los dos experimentos que analizamos (3 y 7 días), se registro el peso corporal de los animales alimentados con las distintas dietas: control (3.1 Kcal/g) e hipercalóricas (3.7 Kcal/g y 4.6 Kcal/g, alta en carbohidratos y grasa respectivamente) cada tercer día. En el experimento de 7 días, se observó un aumento significativo en la ganancia en peso al tercer día de iniciado el consumo de alimento con mayor contenido de grasa al compararse con el grupo control; a partir del cuarto día se observó un incremento significativo entre el grupo alimentado con la dieta alta en grasa con respecto a los otros dos grupos. El grupo alimentado con una dieta de 3.7 Kcal/g rica en carbohidratos mostró un patrón similar al grupo que consumió la dieta control (figura 7).

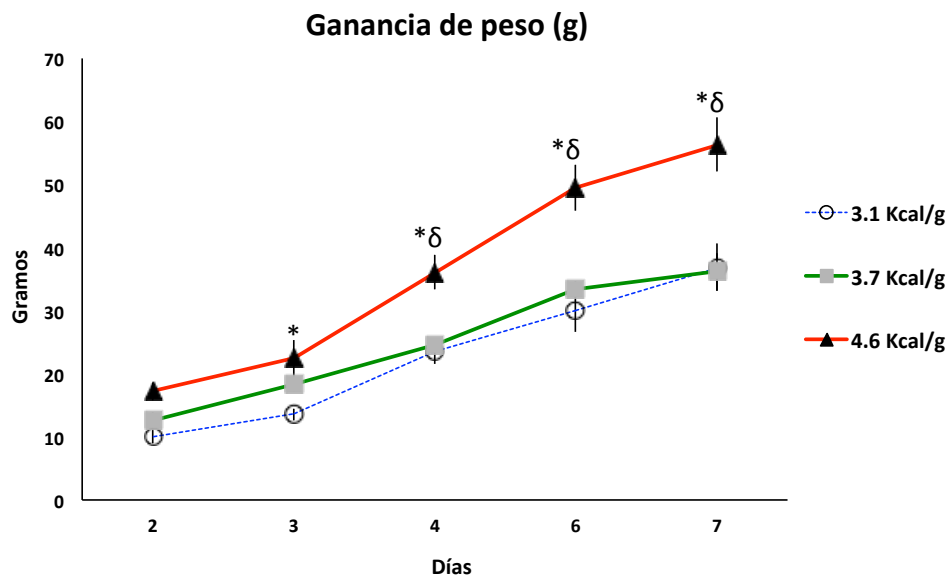


Fig. 7. Gráfica del patrón observado de la ganancia en peso (g) de las ratas alimentadas con dietas de diferente composición y contenido energético. Significancia estadística: \*  $p < 0.01$  con respecto al grupo control;  $\delta$   $p < 0.05$  con respecto al grupo alto en carbohidratos. En los días 2 y 3 se analizaron 12 ratas por grupo y en los días posteriores la n fue de 6 ratas por grupo.

## 12.2. Consumo de alimento, agua y calorías en ratas control y mantenidas con alimento hipercalórico.

Al incrementar el contenido de carbohidratos o grasa en el alimento se logró un aporte mayor de calorías. Si bien las dietas que utilizamos provienen de la misma compañía, tienen diferente textura, forma y color por lo que realizamos mediciones que nos permitieran conocer si existía preferencia por alguna de las dietas experimentales; encontramos que no hubo preferencia en el consumo de los tres alimentos utilizados en este proyecto. El consumo de los nuevos alimentos no alteró el consumo total de agua (panel inferior derecho). En el panel de la izquierda se muestra el consumo calórico (Kcal) observado a los días 2, 4 y 6 con las diferentes dietas. El grupo alimentado con dieta alta en grasa tuvo un mayor aporte calórico con respecto a los otros dos grupos, esto debido a que la dieta contiene un mayor contenido energético/g. Además, se observó que la dieta rica en carbohidratos, incrementó 31% y 25% ( $p < 0.01$ ) el consumo calórico al compararse con la dieta control durante dos y cuatro días respectivamente, no

obstante el consumo de calorías al día 6 es igual que el grupo con la dieta control. En el panel superior derecho se observa que el consumo total de kilocalorías aumentó significativamente sólo al consumir la dieta alta en grasa, este cambio se observa al compararse con las otras dos dietas en el experimento de 7 días, sin embargo a los 3 días de consumo de alimento alto en grasa solo se observó cambio significativo sólo al compararse con la dieta control.

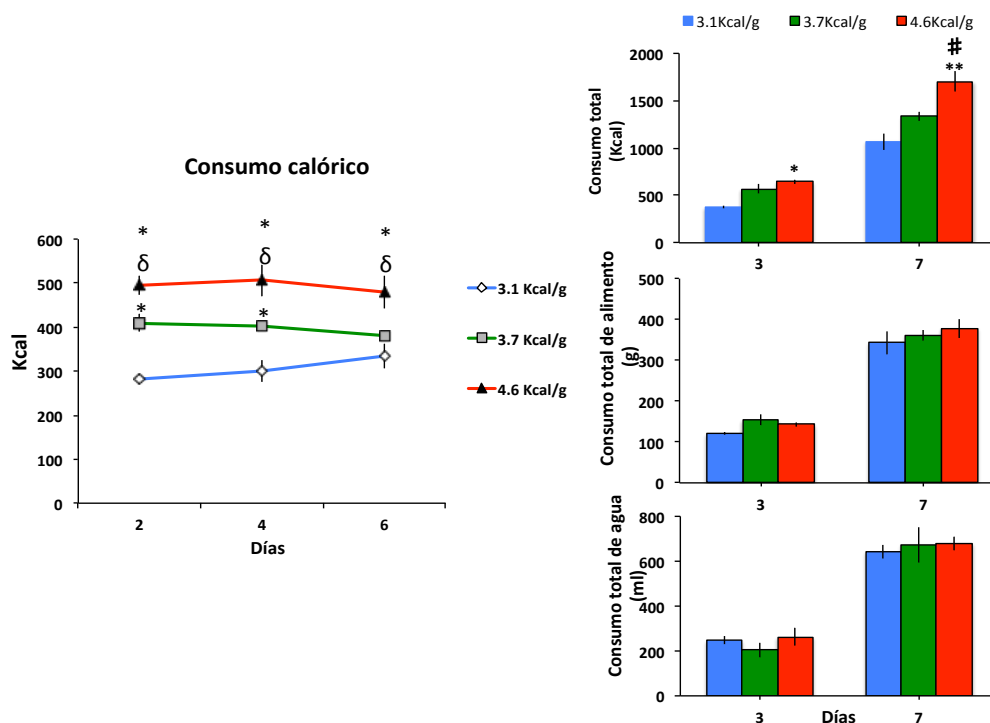


Fig. 8. Consumo de alimento, calorías y agua por un periodo de 3 y 7 días en ratas alimentadas con dietas hipercalóricas. En la gráfica de la izquierda se muestran las calorías ingeridas tanto de la dieta control como hipercalóricas. En la figura de la derecha (panel superior) los histogramas representan las calorías totales consumidas por 3 o 7 días. En los paneles derechos medio e inferior las barras corresponden al consumo total de alimento y agua por 3 ó 7 días. Los valores están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (ESM). Significancia estadística:  $\delta$   $p < 0.05$  y #  $p < 0.01$  con respecto al grupo que consumió alimento de 3.7 Kcal/g; \*\*  $p < 0.01$  y \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control. El número de muestras analizadas fue de 6 ratas por grupo.

### 12.3. Efecto de las diferentes dietas sobre el peso de la grasa corporal.

En la figura 9 se muestran los cambios observados en el peso de la grasa de diferentes regiones y tipo de grasa en respuesta al consumo de las diferentes

dietas. El peso de la grasa blanca epididimal presentó un aumento rápido (3 días) al consumo de dieta alta en grasa con respecto a los otros dos grupos, determinándose un aumento de 31% ( $p < 0.05$ ) y 29% con respecto a los grupos control y alto en carbohidratos; esto no se observó en la grasa blanca retroperitoneal, la cual no se modificó significativamente en ninguno de los grupos experimentales. El peso de la grasa blanca escapular (grasa subcutánea) mostró después de 7 días de consumo de la dieta alta en grasa incrementos de 49% ( $p < 0.05$ ) y 32% con respecto al grupo control y alto en carbohidratos respectivamente. Es importante destacar que el peso de la grasa parda escapular se incrementó tanto en los grupos que ingirieron dieta alta en grasa o en carbohidratos a los 3 y 7 días de su consumo; hubo un aumento del peso de la grasa con respecto al grupo control del 23% ( $p < 0.01$ ) con la dieta alta en carbohidratos y 26% ( $p < 0.01$ ) con la dieta alta en grasa a los 3 días; los aumentos fueron de 21% ( $p < 0.01$ ) con la dieta de carbohidratos y 28% ( $p < 0.01$ ) con la dieta de grasa a los 7 días de consumo con respecto a la dieta control.

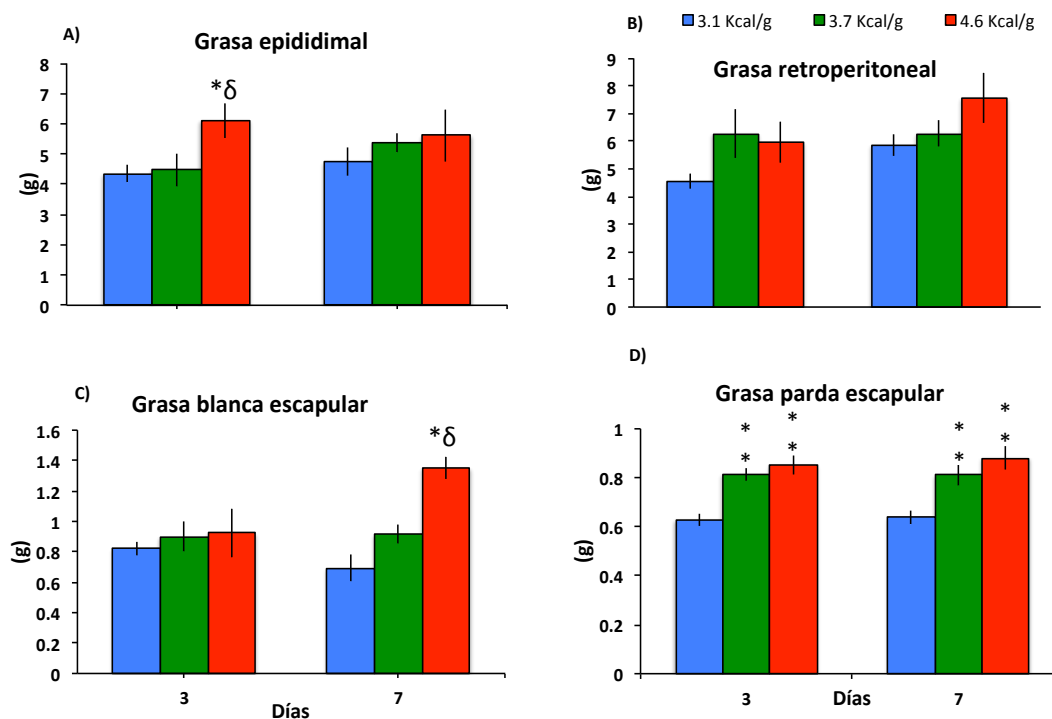


Fig. 9. Determinación del peso del tejido graso en diferentes regiones del cuerpo de la rata: grasa blanca epididimal (A), retroperitoneal (B), escapular (C) y grasa parda escapular (D). La grasa se disectó

inmediatamente después del sacrificio y se peso en una balanza granataria. Los histogramas representan el promedio  $\pm$  ESM de los diferentes tipos de grasa después de consumir por 3 y 7 días las diferentes dietas. El número de ratas analizadas fue de 6 por grupo. Significancia estadísticas:  $\delta$   $p < 0.05$  con respecto al grupo que consumió dieta alta en carbohidratos;  $**p < 0.01$  con respecto al grupo control.

12.4. Influencia de la dieta sobre el nivel circulante de la glucosa, insulina y la relación glucosa/insulina, la leptina, la relación leptina/insulina, la corticosterona y los pesos de glándulas adrenales.

a) Concentración de glucosa e insulina y relación glucosa/insulina en suero.

El consumo de las dietas hipercalóricas durante 3 días no modificó la concentración de glucosa, mientras que a los 7 días de la ingestión de dieta alta en grasa aumentó la concentración por 9% ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control (panel A). De acuerdo a lo reportado, la concentración de insulina en suero se incrementó rápidamente en respuesta a un mayor consumo calórico desde los 3 días. Determinamos que después de 3 días de consumo la insulina aumentó 54% ( $p < 0.05$ ) con la dieta alta en carbohidratos y 58% con la dieta alta en grasa con respecto al grupo control y a los 7 días observamos 43% de aumento con la dieta de 3.7 Kcal/g y 52% ( $p < 0.01$ ) con la dieta de 4.6Kcal/g con respecto al grupo control (panel B). En el panel C graficamos la relación de la concentración de glucosa e insulina, y de acuerdo a lo esperado la relación es significativamente menor en los grupos que fueron alimentados con dietas hipercalóricas a los 3 y 7 días (figura 10).

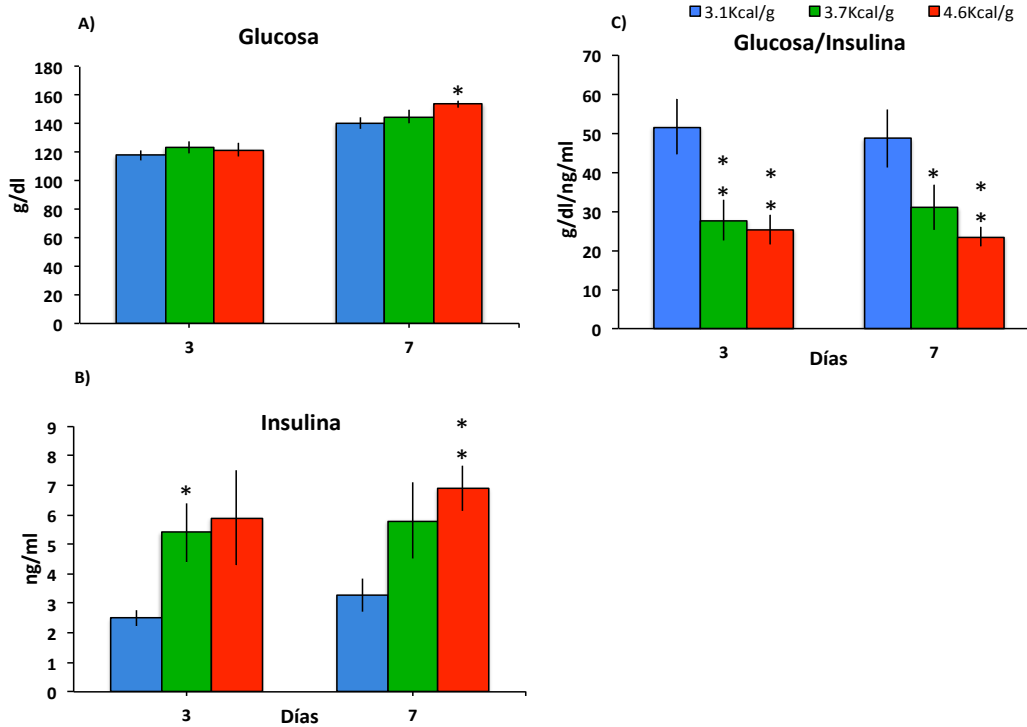


Fig.10. Influencia de la dieta hipercalórica sobre el nivel circulante de glucosa (panel A) e insulina (panel B), y la relación glucosa/insulina (panel C). La glucosa fue determinada por un método electroquímico y la insulina fue determinada con un kit de ELISA. Los histogramas representan el promedio  $\pm$ ESM, en cada grupo experimental se analizaron 6 muestras. Significancia estadística: \* $p < 0.05$ . \*\* $p < 0.01$  con respecto al grupo control.

#### b) Cuantificación de leptina circulante y relación leptina/insulina en suero.

En los animales que consumieron dieta rica en carbohidratos o en grasa, encontramos que aumentaron rápidamente los niveles de leptina en suero a los tres días 34% ( $p < 0.05$ ) y 50% ( $p < 0.01$ ) en el orden mencionado, con respecto a la dieta control; este efecto significativo se mantuvo a los siete días sólo en el grupo que fue alimentado con dieta alta en grasa (panel A). En el panel B se gráfico la relación de las concentraciones de la leptina e insulina en el suero, donde se observa que a los tres días de consumo de las dietas hay una relación menor entre los grupos que consumieron dietas ricas en carbohidratos o en grasa respecto al grupo control sin que el efecto sea significativo, mientras que a los 7 días la diferencia en la relación (leptina/insulina) fue significativa entre los grupos que consumieron dieta rica en carbohidratos y la dieta control (figura 11).

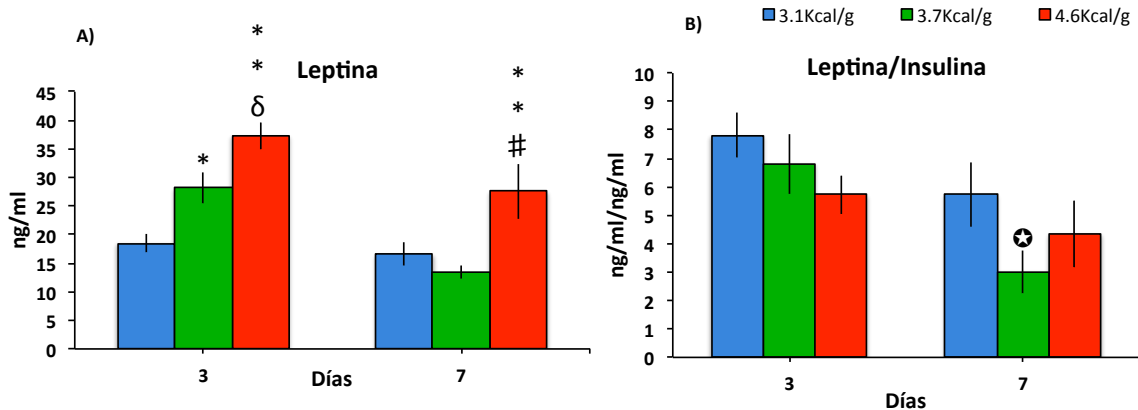


Fig. 11. Efecto del consumo de una dieta rica en grasa o en carbohidratos sobre el nivel de leptina en suero (panel A) y la relación de la concentración de leptina e insulina (panel B). La leptina en suero se cuantificó utilizando un kit de ELISA. Los histogramas representan el promedio  $\pm$  ESM. En cada grupo experimental se analizaron 6 muestras. Significancia estadística, \*\*  $p \leq 0.01$ , \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control;  $\delta$   $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$  con respecto al grupo alto en carbohidratos;  $\oplus$   $p < 0.05$  con respecto al grupo rico en grasa.

### c) Peso de las glándulas adrenales y cuantificación de la corticosterona sérica.

El consumo de dietas hipercalóricas no modificó el peso de las glándulas adrenales en los tiempos cortos de nuestro experimento (tres o siete días). En la concentración de corticosterona en suero no observamos modificaciones significativas por la ingestión de las dietas hipercalóricas comparadas con la dieta control; se observa un patrón similar a los dos tiempos experimentales con una tendencia en aumento en los animales alimentados con la dieta alta en carbohidratos y en grasa (figura 12).



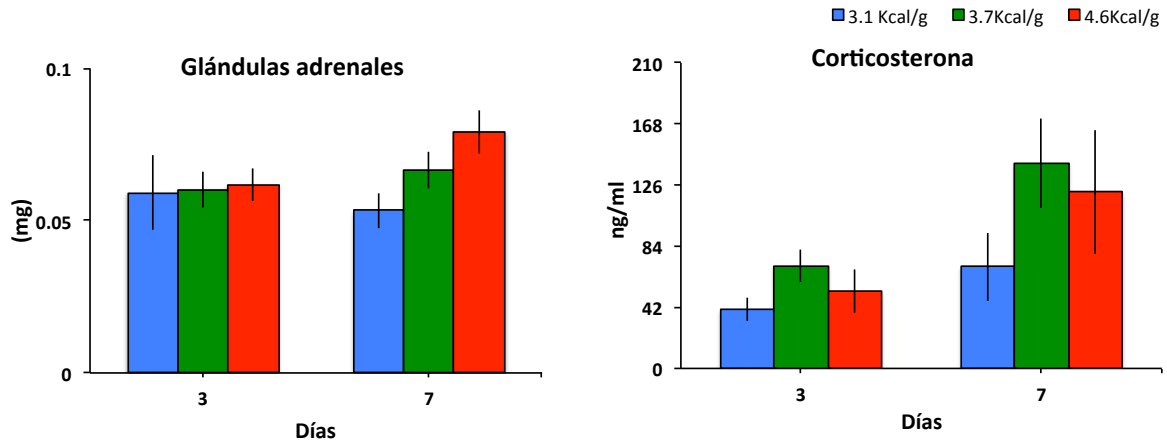


Fig. 12. Efecto de las dietas sobre el peso de las glándulas adrenales y la concentración de corticosterona en suero. Las glándulas adrenales (panel izquierdo) fueron disectadas inmediatamente después del sacrificio y pesadas en una balanza granataria; la concentración de corticosterona (panel derecho) fue cuantificada en suero por RIA. Los histogramas representan el promedio  $\pm$  ESM, se analizaron 6 animales por grupo experimental.

### 12.5. Efecto de dietas hipercalóricas sobre las concentraciones séricas de hormonas del eje tiroideo: TSH, T3 y T4.

La TSH circulante no mostró diferencias significativas entre el grupo control y los grupos que consumieron las dietas hipercalóricas, si bien se observan concentraciones bajas en esas dietas a los siete días de ingestión. Respecto a la concentración de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en suero tampoco se encontraron diferencias con el consumo de las diferentes dietas a los 3 ó 7 días de experimentación (figura 13).

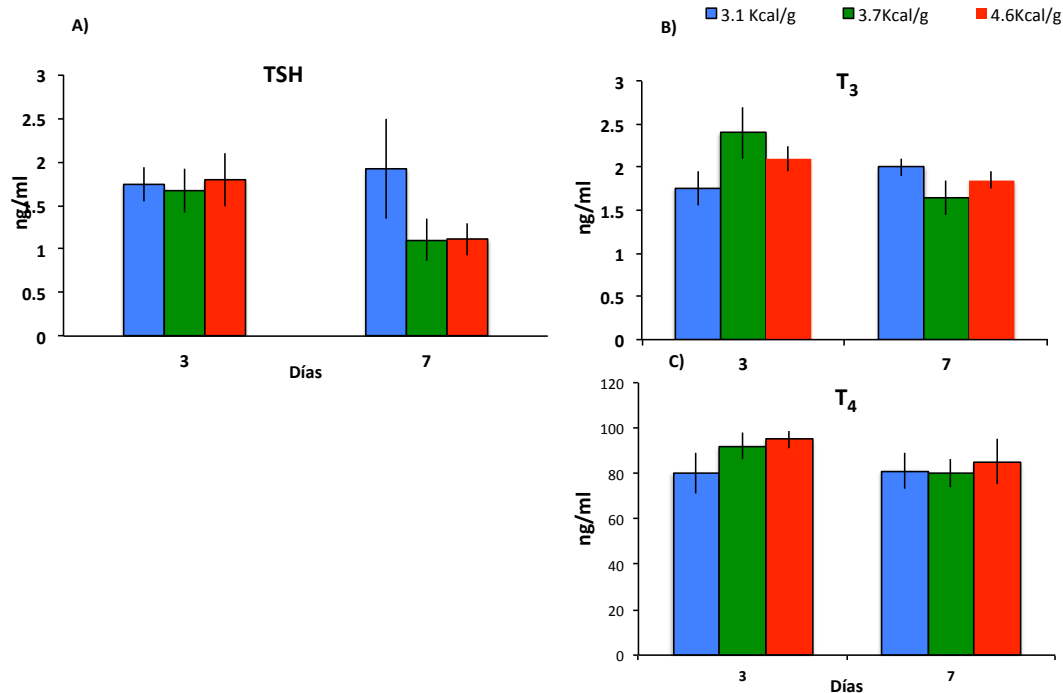


Fig. 13. Influencia de la dieta rica en carbohidratos o grasa sobre el nivel de tirotrópina y hormonas tiroideas circulantes. La tirotrópina (panel A) en suero fue cuantificada por RIA así como las hormonas tiroideas T<sub>3</sub> (panel B) y T<sub>4</sub> (panel C).

## 12.6. Efectos de la dieta rica en carbohidratos o grasa sobre el nivel de RNA mensajeros en diferentes núcleos del hipotálamo: NPV, AP, HA, HL y HP.

### 12.6.1. Cambios en el nivel de RNAm de la TRH en NPV, AP, HA, HL y HP.

La expresión del RNA mensajero de la TRH en el NPV respondió rápidamente al efecto de las dietas, incrementando significativamente 19% después de tres días de iniciada la ingestión de alimento rico en carbohidratos o grasa con respecto al grupo control. No obstante, este cambio parece adaptarse cuando los animales ingirieron el alimento durante 7 días ya que no observamos diferencias significativas en el RNAm de TRH en respuesta al consumo de ningún alimento hipercalórico. En el área preóptica también se observaron cambios significativos, a diferencia de lo observado en el NPV, el RNAm de TRH disminuyó 38% ( $p < 0.05$ ) y

35% ( $p < 0.05$ ) en el grupo de animales que consumió dieta rica en carbohidratos y baja en grasa por 3 días, con respecto a los grupos que consumieron alimento control y rico en grasa respectivamente. El efecto opuesto se observó a los 7 días, observándose un incremento de 17% ( $p < 0.05$ ) y 24% con respecto a los grupos mantenidos con dieta control o rica en grasa. En el hipotálamo anterior solo observamos un aumento en el RNAm de TRH al séptimo día en respuesta al consumo de alimento rico en carbohidratos, comparado con el control y rico en grasa, similar a lo sucedido en el área preóptica. Por otro lado, en el hipotálamo lateral los niveles de RNAm de TRH disminuyeron significativamente al día 3 después de iniciado el consumo de alimento alto en grasa por 40% y 44% ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control y al grupo con alimentación rica en carbohidratos respectivamente; además en este grupo se incrementó el nivel de RNAm de TRH con respecto al grupo control por 23% ( $p < 0.01$ ) después de siete días de ingestión del mismo. En el hipotálamo posterior no se observó ningún cambio en el nivel de RNAm de TRH dependiendo de la dieta o el tiempo de consumo de las mismas (figura 14).

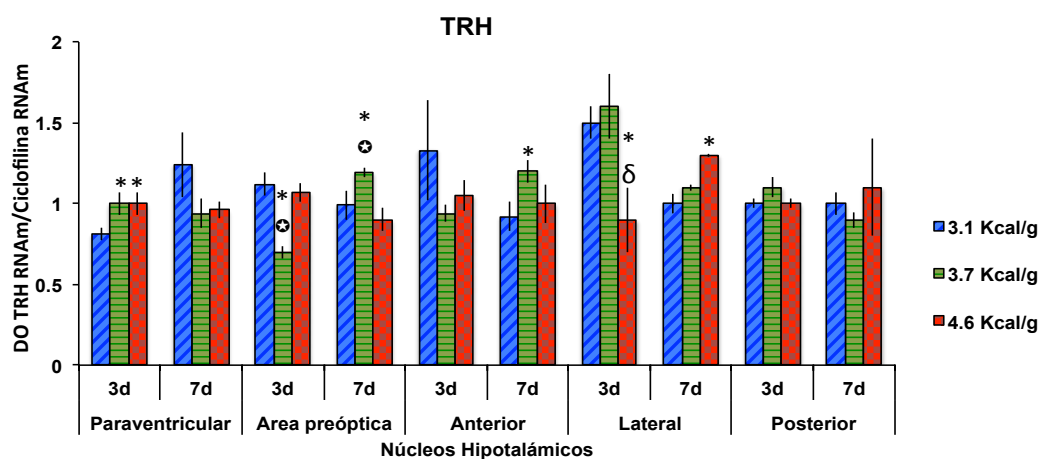


Fig. 14. Influencia de la dieta sobre el nivel de RNAm de la TRH en los diferentes núcleos hipotalámicos. El RNAm de la TRH y ciclofilina fue cuantificado por RT-PCR de punto final. Los histogramas representan el promedio  $\pm$ ESM del cociente de la densidad de la banda de DNA amplificada para el RNAm de TRH y la banda del RNAm de ciclofilina, ambas sometidas a electroforesis en gel y teñidas con bromuro de etidio. En cada grupo se analizaron de 4-6 muestras. Significancia estadística: \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control;  $\delta$   $p < 0.05$  con respecto al grupo con dieta rica en carbohidratos;  $\oplus$   $p < 0.05$  con respecto a la dieta rica en grasa.

### 12.6.2. Cambios en el nivel de RNAm de TRH- R1 en NPV, HL y HP.

Cuantificamos el RNAm del TRH-R1 como parte del sistema TRHérgico hipotalámico. En el NPV no encontramos ningún efecto del tipo de alimento que consumieron los animales en los grupos de 3 y 7 días. En el hipotálamo lateral sólo observamos un aumento significativo de 33 y 40% ( $p < 0.01$ ) en los animales que consumieron la dieta hipercalórica rica en grasa por siete días con respecto al grupo que consumió la dieta control o rica en carbohidratos. En el hipotálamo posterior no se observaron cambios en el nivel del RNAm de TRH R-1 en ninguno de los tiempos o dietas empleadas (figura 15).

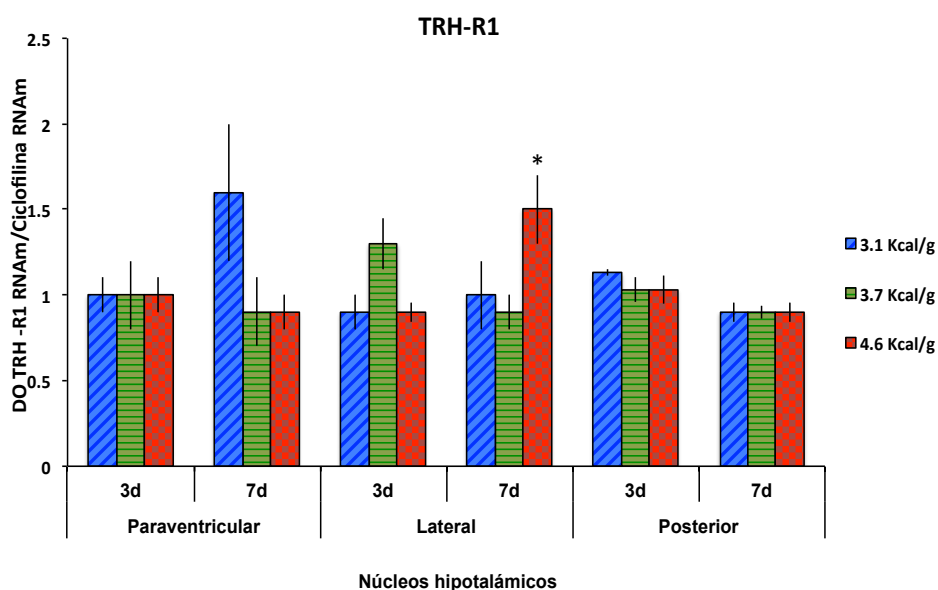


Fig. 15. Influencia de la dieta sobre el nivel de RNAm de TRH-R1 en el NPV, HL, HP. Los RNAm de TRH-R1 y ciclofilina fueron cuantificados por RT-PCR punto final. Los histogramas representan el promedio  $\pm$ ESM del cociente de la densidad de la banda de DNA amplificada para el RNAm de TRH y de la banda del RNAm de ciclofilina, ambas sometidas a electroforesis en gel y teñidas con bromuro de etidio. En cada grupo se analizaron de 4-6 muestras. Significancia estadística: \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

### 12.6.3. Cambios en el nivel del RNAm de TRH- R2 en el HL e HP.

El RNAm del receptor TRH-R2 no fue cuantificado en el NPV debido a falta de muestra de RNA total. En los núcleos lateral y posterior sí se logró cuantificar el

RNA<sub>m</sub> del receptor de TRH-R2 en todos los grupos experimentales a 3 y 7 días. Sin embargo, no encontramos cambios significativos en los animales que consumieron dietas hipercalóricas en ninguno de los tiempos analizados (figura 16).

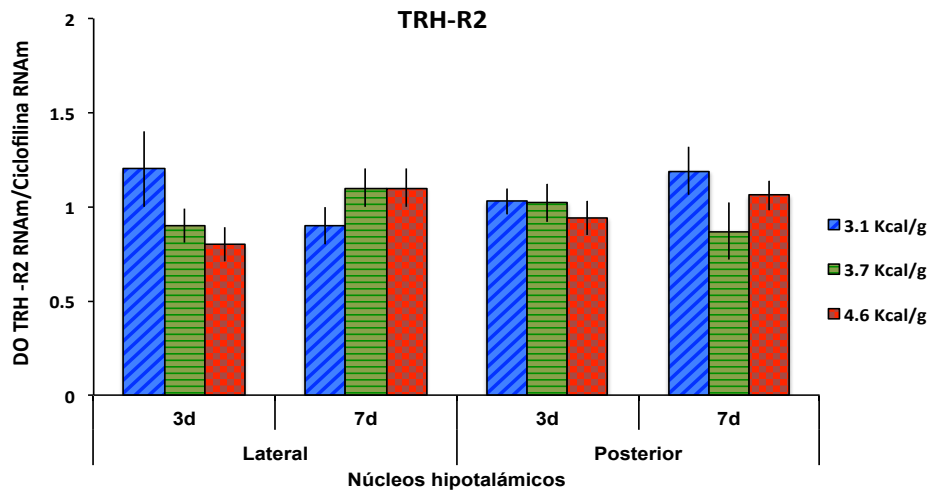


Fig. 16. Influencia de la dieta sobre el nivel de RNA<sub>m</sub> de TRH-R2 en el HL, HP. Los RNA<sub>m</sub> de TRH-R2 y ciclofilina fueron cuantificados por RT-PCR punto final. Los histogramas representan el promedio  $\pm$ ESM del cociente de la densidad de la banda de DNA amplificada para el RNA<sub>m</sub> de TRH-R2 y la banda del RNA<sub>m</sub> de ciclofilina, ambas sometidas a electroforesis en gel y teñidas con bromuro de etidio. En cada grupo se analizaron de 4-6 muestras. Significancia estadística: \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control.

#### 12.6.4. Cambios en el nivel de RNA<sub>m</sub> de PPII en el NPV, HL y HP.

En lo que respecta a la cuantificación del RNA<sub>m</sub> de la piruglutamil peptidasa II, conseguimos semi-cuantificar el RNA<sub>m</sub> en el NPV, HL y HP. En el NPV, se encontró un incremento significativo en el nivel de RNA<sub>m</sub> hasta los siete días de ingestión de la dieta alta en grasa. Detectamos un incremento de 17% ( $p < 0.05$ ) y de 25% ( $p < 0.05$ ) en el grupo alimentado con la dieta rica en grasa con respecto al grupo control y al grupo con dieta rica en carbohidratos. En el hipotálamo lateral, el nivel de RNA<sub>m</sub> de la PPII disminuyó significativamente en los animales con la dieta alta en grasa (3 días) en comparación con las ratas con el alimento control o

rico en carbohidratos, mientras que a los 7 días el nivel de RNAm de la PPII aumentó 60% y 47% ( $p < 0.05$ ) con la ingesta de la dieta alta en carbohidratos con respecto a la dieta control y rica en grasa. En el HP mensajero de la PPII incrementó 27% y 19% en los animales con el alimento con mayor contenido de carbohidratos, con respecto a los animales con la dieta alta en grasa y control (figura 17).

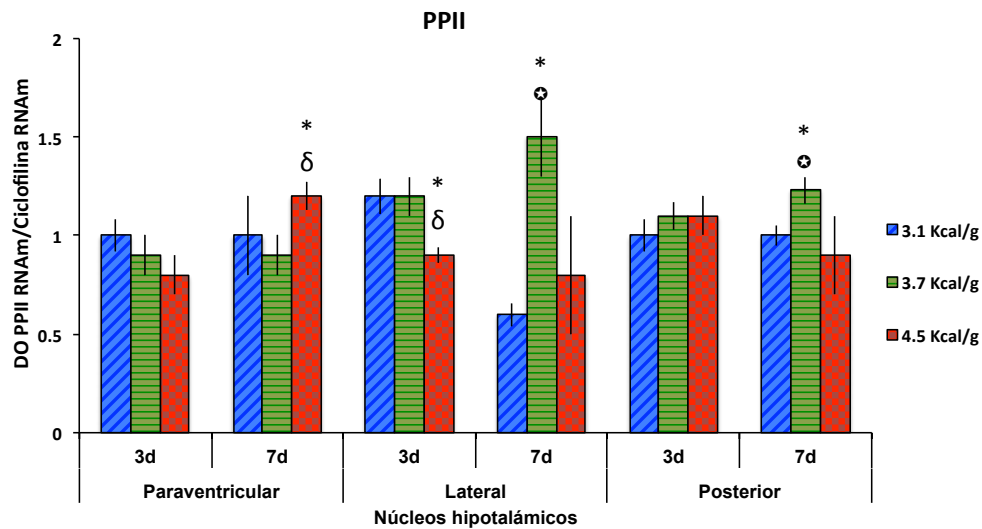


Fig. 17. Influencia de la dieta sobre el nivel de RNAm de PPII en el NPV, HL, HP. Los RNAm de PPII y ciclofilina fueron cuantificados por RT-PCR punto final. Los histogramas representan el promedio  $\pm$ ESM del cociente de la densidad de la banda de DNA amplificada para el RNAm de PPII y la banda del RNAm de ciclofilina ambas sometidas a electroforesis en gel y teñidas con bromuro de etidio. En cada grupo se analizaron de 4-6 muestras. Significancia estadística: \*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control;  $\delta$   $p < 0.05$  con respecto al grupo de dieta rica en carbohidratos,  $\oplus$   $p < 0.05$  con respecto a la dieta rica en grasa (n=4-6)

### 13.- DISCUSIÓN

En este trabajo, elegimos dos dietas comerciales (Harlan) con ligeros incrementos en el aporte calórico y diferente concentración de grasa y carbohidratos con respecto a la dieta que las ratas consumían desde el nacimiento. Esto se hizo para semejar una dieta tipo cafetería o incrementos en las colaciones que pueden generar sobrepeso en los humanos (Ovaskainen *et al.*, 2006; Mozaffarian *et al.*, 2011; Lottenberg *et al.*, 2012). Debido a que las ratas modifican fácilmente su consumo calórico (Lutz y Woods 2012; Rothwell y Stock, 1981) no les dimos la opción de elegir entre una dieta normal o una dieta con mayor cantidad de calorías, esto para forzarlas a incrementar su peso corporal, utilizando este parámetro como indicador de que las ratas desarrollan obesidad (Melhorn *et al.*, 2010).

Observamos que en ratas adultas expuestas a este tipo de dietas, no se modificó la cantidad (g) de alimento que consumen, tanto en el periodo de actividad como en reposo (datos no mostrados). Ya que las dietas experimentales que utilizamos tienen un mayor aporte calórico comparada con la dieta control, el consumo calórico total por rata se incrementó, lo cual se vió reflejado en mayor ganancia de peso corporal, encontrando diferencias significativas al cuarto día de consumo de la dieta rica en grasa con respecto a las dietas de menor aporte calórico. A pesar de que en las ratas que consumieron la dieta rica en carbohidratos (3.7 Kcal/g) se incrementó ligeramente el consumo calórico, no se afectó la ganancia en el peso corporal, posiblemente porque la diferencia en aporte calórico total es sólo de 600 calorías/g con respecto al grupo control.

En nuestras condiciones experimentales, no observamos cambios en el consumo total de alimento al pasar a los animales a un alimento rico en grasa, a diferencia de experimentos monitoreados por 12 y 15 días, donde se muestra que si bien la ingesta calórica incrementa 50% más en ratas alimentadas con dietas tipo “cafetería” comparadas con la control, la cantidad total de alimento consumido fue menor comparado con el grupo control, ya que se ha visto que hay una tendencia a disminuir la cantidad de alimento, además nuestras mediciones fueron

realizadas en periodos de tiempo cortos (Stock y Rothwell, 1981; Melhorn *et al.*, 2010). Esto correlaciona con la inhibición en el consumo de alimento rico en grasa generado por el eje cerebro-intestino e hígado observado en animales que consumen este tipo de alimentos por más de una semana (Lam *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2013). Por lo que las ratas subieron su peso corporal al alimentarse con una mayor cantidad de calorías y no por la cantidad de alimento.

Observamos efectos diferenciales sobre los tipos de grasa corporal que analizamos posterior al consumo de dietas hipercalóricas. Encontramos que la grasa parda escapular incrementó rápidamente en los animales que ingirieron las dos dietas hipercalóricas, lo que sugiere que este tipo de grasa esta acumulando el exceso de calorías en forma de triglicéridos aumentando la lipogénesis. Cambios rápidos en el tejido adiposo café (BAT, por sus siglas en inglés), por ejemplo activando proteínas involucradas en la termogénesis, son consistentes con el hecho de que este tejido tiene una actividad muy dinámica que contribuye a contrarrestar la obesidad (Himms, 1990; Yoshioka *et al.*, 1992; Frühbeck *et al.*, 2009). El tejido adiposo café es el principal regulador de la termogénesis, transformando la energía almacenada en calor. Se ha demostrado que tanto la ingestión de alimento como la exposición al frío incrementan la producción de calor por el tejido adiposo pardo, lo que aumenta la temperatura corporal así como la temperatura intra-tejido adiposo café de ratas obesas (Bjørndal *et al.*, 2011; Silva, 2006). El incremento en la generación de calor ocurre a través de la expresión de la proteína desacopladora UCP1 (localizada en la membrana mitocondrial interna) donde desacopla el flujo de electrones de la fosforilación oxidativa produciendo calor en vez de ATP, aumentando el consumo de oxígeno y promoviendo el gasto energético mediante la lipólisis de ácidos grasos libres (Cannon y Nedergaard, 2004). Se han diferenciado dos tipos de termogénesis, una denominada obligatoria (metabolismo basal) y otra adaptativa o facultativa. En la primera ocurren las reacciones metabólicas esenciales como absorción de nutrientes y la respiración celular. En la segunda, el índice metabólico incrementa en respuesta a la exposición al frío o a una dieta hipercalórica produciendo calor.



La termogénesis facultativa esta activada por el sistema nervioso simpático, esto a su vez lleva a la producción de hormonas tiroideas y a la síntesis de ácidos grasos, lo cual sirve como sustrato para la termogénesis en el BAT. Este efecto no se mantiene por largo tiempo, ya que tiempos prolongados de consumo de alimento hipercalórico inducen hipertrófia e hiperplasia del tejido pardo, incluyendo una disminución en la UCP1 lo que conlleva a desarrollar obesidad en los organismos (Hansen *et al.*, 2010; Himms, 1990; Silva, 2006). Otros autores demostraron que la activación de la glucocinasa hepática (enzima limitante en el primer paso de la glicólisis) vía el nervio vago, induce incremento en el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo café, disminuye la expresión de la UCP1 y la termogénesis adaptativa; lo que contribuye a una mayor ganancia de peso. El silenciamiento (knockdown) de la glucocinasa promueve aumentos en la termogénesis del BAT y suprime la ganancia en peso en respuesta a un mayor consumo calórico (Tsukita *et al.*, 2012).

El tejido adiposo blanco está relacionado con incremento del peso corporal debido a que el tamaño y el número de adipocitos incrementa en animales que desarrollan obesidad. También almacena el exceso de calorías de la dieta en forma de triglicéridos para su posterior liberación en condiciones de demanda energética, como el ayuno. Este tejido se divide principalmente en: grasa subcutánea y grasa intra-abdominal visceral. Se sabe que en individuos obesos con diabetes tipo 2, la grasa visceral es lipolíticamente más activa que la grasa subcutánea, ésta a su vez contribuye a incrementar los niveles de ácidos grasos libres en plasma que son almacenados en el adipocito en forma de triglicéridos y debido al exceso de lípidos se forman nuevos adipocitos. Este proceso, aunado a un escaso gasto energético produce obesidad, ya que el tejido sufre hipertrofia e hiperplasia. Se ha visto que los depósitos epididimales incrementan en roedores alimentados con dietas tipo cafetería (Bjørndal *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2004). De acuerdo con estos reportes, encontramos que sólo la grasa epididimal (visceral) incrementó rápidamente su peso en respuesta al consumo de dieta rica en grasa y el efecto fue transitorio, ya que solo se observó a los 3 días de

consumo. Por otro lado, la grasa blanca escapular (subcútea) respondió más tarde que la grasa epididimal, ya que aumento sólo en respuesta a la dieta rica en grasa a los 7 días de consumo. También observamos ligeros incrementos en la grasa retroperitoneal con respecto al control. Algunas evidencias sugieren que esta respuesta en el tejido graso blanco se debe probablemente a un incremento en la lipogénesis. Sin embargo, también pueden activarse genes relacionados con la lipólisis, ya que las dietas de alto contenido graso pueden modular procesos metabólicos como composición y cantidad de ácidos grasos en el tejido adiposo (Fernández *et al.*, 2007; Coenen, 2007). Otros autores han visto que dietas altas en grasa con elevados niveles de ácidos grasos saturados aumentan los niveles circulantes de lípidos, lo que provoca incrementos en los neuropéptidos orexigénicos (como orexinas), sugiriendo que el tipo de grasa en la dieta puede determinar el consumo de calorías (Barson *et al.*, 2012).

Al igual que otros autores, en nuestros experimentos observamos que algunos mediadores del balance energético (como la leptina) se alteraron en respuesta al consumo de dietas hipercalóricas por periodos cortos. Los niveles circulantes de leptina respondieron rápidamente, incrementándose desde los tres días de iniciado el consumo de la dieta alta en grasa; esta respuesta correlaciona con el aumento en peso del tejido adiposo, el cual libera leptina para contrarrestar el consumo calórico diario ya que esta hormona activa mecanismos de saciedad debido a su actividad anorexigénica (Schawartz *et al.*, 2000). Se ha mostrado que la leptina puede ser liberada del tejido graso pardo y del tejido adiposo blanco (Moinat *et al.*, 1995; Cinti *et al.*, 1997). La resistencia a la leptina es un factor clave para el desarrollo de la obesidad, ya que elimina esta señal de saciedad. Entre las señales anorexigénicas que son activadas por leptina está la insulina, una hormona pancreática que incrementa en respuesta al consumo de alimento y estimula mecanismos de utilización de glucosa en los adipocitos y mecanismos de saciedad (Berthoud y Morrison, 2008). La leptina inhibe la secreción de insulina de las células  $\beta$  pancreáticas, mientras que la insulina estimula la producción de leptina en el adipocito. La interacción de estas hormonas tiene un papel importante

en la regulación del balance energético (Margetic *et al.*, 2002; Seufert *et al.*, 1999; Amitani *et al.*, 2013). Como se mencionó anteriormente, ambas hormonas se incrementaron rápidamente en respuesta a un mayor consumo calórico, pero la relación leptina/insulina fue menor a los siete días de experimentación con el consumo de dieta rica en carbohidratos, comparada con la dieta control y rica en grasa. Estos datos nos indican que aunque la dieta rica en carbohidratos no modificó el peso corporal y el contenido de grasa corporal, es capaz de inducir cambios en algunas hormonas involucradas en el balance energético como la leptina y la insulina. Las mediciones de glucosa en sangre sólo se alteraron en el grupo que consumió dieta alta en grasa por 7 días; esto correlaciona con el incremento en el nivel de insulina, el cuál fue mayor en los grupos que consumieron dietas hipercalóricas lo que probablemente contribuyó a mantener el nivel basal de glucosa en sangre ya que la relación glucosa/insulina fue menor en los animales que consumieron las dietas hipercalóricas con respecto al grupo control. La insulina respondió rápidamente a un mayor consumo de calorías; esta respuesta le permitió a los animales regular el nivel de glucosa en sangre, a pesar de consumir mayor cantidad de azúcares o grasa con respecto al grupo control.

Los glucocorticoides son los principales reguladores del metabolismo de carbohidratos y lípidos, son también importantes en la homeostasis y en las respuestas a condiciones de estrés; pueden aumentar o disminuir la síntesis de proteínas (por ejemplo la TRH). La corticosterona es el principal glucocorticoide en la rata. A pesar de que los animales fueron sometidos a un nuevo régimen de alimentación, no se mantuvieron estresados ya que no detectamos cambios en el peso de las glándulas adrenales, como se ha reportado en modelos de estrés donde se observa un cambio de tamaño en éstas glándulas. Los niveles de corticosterona en suero no se alteraron significativamente. Sin embargo, no podemos descartar la participación de la corticosterona en el incremento del peso del animal o de la grasa, puesto que los glucocorticoides intervienen en el metabolismo basal generando glucosa en sangre para contender con el estrés o bien pueden favorecer el almacenamiento de los carbohidratos y triglicéridos en el

tejido graso (Dallman et al., 2004, Joseph-Bravo P y de Gortari P. 2007). La obesidad se ha asociado a alteraciones en la función del eje adrenal, el cual se activa en respuesta a estrés. La activación de este eje puede inducir incrementos en los niveles de corticosterona, con efectos hiperfágicos y antitermogénicos; se ha visto que niveles elevados de glucocorticoides están relacionados con el desarrollo de obesidad abdominal junto con el consumo de una dieta rica en grasa. Además animales con administración intracerebroventricular de glucocorticoides mostraron incrementos en la ingestión y peso corporal, mientras que otros estudios presentaron inhibición (Liu *et al.*, 2011). Por otro lado, los ratones *ob/ob* presentan niveles elevados de corticosterona, mientras que la inyección de leptina reestablece los niveles séricos de glucocorticoides.

No encontramos cambios significativos en la concentración de TSH,  $T_3$  y  $T_4$  en los animales que consumieron dietas hipercalóricas. La TSH, hormona responsable de la liberación de las hormonas tiroideas, mostró disminución en los animales que consumieron dietas hipercalóricas. Sin embargo, dichos cambios no fueron significativos, por lo que consideramos que la actividad del eje tiroideo este adaptándose a la ingestión de dietas hipercalóricas, debido a la actividad que mostró el RNAm de la TRH en el NPV. Dado que es posible que la actividad termogénica del BAT esté aumentada y se sabe que la  $T_3$  juega un papel importante en esta acción al modular la actividad de la UCP 1 para producir calor, es posible que la  $T_3$  que participa en la producción de calor en respuesta a un mayor consumo calórico se obtenga de síntesis local por una mayor actividad de la desiodasa 2 (Bianco y McAninch, 2013).

Los elementos del eje tiroideo como la TSH y las hormonas tiroideas circulantes, no se modificaron por el consumo agudo de dietas hipercalóricas, mientras que el nivel de RNAm de la TRH en el NPV mostró incrementos rápidos y transitorios en respuesta al cambio en el balance energético positivo establecido por las dietas. Previamente se ha demostrado que las neuronas TRHérgicas del NPV sensan cambios en el estado energético de la rata (Uribe *et al.*, 1993). La exposición al frío incrementa el nivel de RNAm de la TRH del NPV en forma rápida

y transitoria. Se ha propuesto que la liberación de la TRH de la eminencia media contribuye a incrementar el nivel de hormonas tiroideas, que vía el sistema simpático, activan la termogénesis en el tejido adiposo café (Arancibia *et al.*, 1996; Nillni, 2010).

Condiciones de balance energético negativo como el ayuno por 48 horas disminuyen el nivel de RNAm de la TRH en el NPV y este efecto correlaciona con la disminución en la concentración de leptina en sangre (Lechan y Fekete, 2006; Fekete *et al.*, 2000a,b). La restitución de leptina en ratas ayunadas revierte el efecto sobre el nivel del RNAm de la TRH en el NPV. Estos datos sugieren que el efecto observado en el RNAm de la TRH en el NPV en respuesta al incremento en el nivel energético del organismo, puede deberse al incremento en el nivel de leptina (Legradi *et al.*, 1997). Queda por confirmarlo experimentalmente y si es el caso por definir si el efecto de la leptina es directo o a través de la actividad de las neuronas de POMC que se activan en respuesta a un mayor consumo calórico (Cowley *et al.*, 2001; Perello *et al.*, 2010).

Los cambios en el nivel de RNAm de la TRH son transitorios, ya que demostramos que a los 7 días de consumo de dietas hipercalóricas no se observaron los mismos efectos, a pesar de que el nivel de leptina se mantiene aún elevado en el caso de la dieta alta en grasa. Por otro lado, el nivel de RNAm de la TRH en el NPV de ratas que consumen dietas hipercalóricas por más tiempo (1 o dos meses) está elevado en este núcleo (Araujo *et al.*, 2010; Perello *et al.*, 2010). Es posible entonces, que inicialmente las neuronas TRHérgicas del NPV al sentir un aumento en el balance energético se activan para contrarrestarlo; sin embargo, a los 7 días, momento en el cual se activan mecanismos de saciedad que tienden disminuir la entrada de energía al organismo, parece que estas señales de saciedad compiten contra las que mantienen el balance energético positivo, por lo que la biosíntesis de TRH tiende a disminuir con respecto al grupo control. Finalmente cuando el organismo continúa ingiriendo un exceso calórico es posible que la pérdida de las señales de saciedad, por ejemplo la resistencia a leptina genera que éstas neuronas nuevamente incrementen el nivel de RNAm de la TRH

que contribuye a generar hipertensión en el animal (Burgueño *et al.*, 2007). Debido a que las neuronas TRHérgicas del NPV son heterogéneas, es probable que sólo un subgrupo de neuronas TRHérgicas estén respondiendo al inicio del balance energético positivo. Sería importante definir si estas forman parte del 10% de neuronas TRHérgicas que responden directamente a la leptina (Harris *et al.*, 2001). Además, se ha visto que el nivel de RNAm de la TRH en el hipotálamo, se incrementa en respuesta al tratamiento con topiramato, un medicamento que suprime el apetito e incrementa el gasto energético en ratones obesos después de 8 días de tratamiento y que también aumenta la señalización y acción de leptina e insulina en el hipotálamo (Caricilli *et al.*, 2012).

Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* demostraron que la leptina puede actuar directamente sobre las neuronas TRHérgicas del NPV y estimular la expresión del gen precursor de TRH vía STAT3 (Guo *et al.*, 2004). Estos análisis mostraron que la señalización de leptina en el hipotálamo interacciona con la expresión de la TRH induciendo un incremento en el nivel de RNAm, lo que ayudó a reducir la ingestión de alimentos y aumentó el gasto energético. Se han propuesto dos vías de interacción entre la leptina y la TRH en el hipotálamo: una que involucra la acción directa de la leptina sobre sus receptores localizados en neuronas TRHérgicas aumentando la síntesis de la TRH y la vía indirecta donde la leptina actúa sobre neuronas POMC liberando  $\alpha$ -MSH que a su vez estimula a la TRH (Nillni, 2010). Además del núcleo arcuato y el NPV, otras regiones hipotalámicas como el hipotálamo lateral, posterior y área preóptica, tienen neuronas blanco para la señalización de leptina lo que podría sugerir que estas neuronas también participan en modular el gasto energético a través de la leptina (Elmqvist, 2001; Schwartz *et al.*, 1996). Los resultados de nuestro proyecto mostraron niveles elevados de leptina circulante y de RNAm de la TRH en el NPV con solo tres días de consumo de dietas hipercalóricas, si bien un cambio en el peso del animal es sólo detectable con la dieta alta en grasa, son necesarios más experimentos que confirmen esta correlación.

La aplicación de la TRH en el ventrículo lateral disminuye el consumo de alimento y el peso corporal en la rata, por lo que se ha propuesto que tiene actividad de anorexigénico (Choi *et al.*, 2002). Sin embargo, a la fecha no se ha definido claramente cual es la región (o regiones) del sistema nervioso central que produce a la TRH implicada en esta función así como su región blanco, por lo que nos interesó buscar otros núcleos hipotalámicos que pudieran tener modificaciones en los elementos TRHérgicos respondiendo a mayor consumo calórico.

En el hipotálamo lateral, encontramos que el RNAm de TRH sólo respondió al consumo de dieta alta en grasa; al igual a lo observado en el NPV, los cambios fueron rápidos pero en sentido opuesto a los que encontramos el NPV, con una disminución a los 3 días e incremento a los 7 días. Esta región se caracteriza por ser necesaria para expresar el hambre; la TRH se expresa en la región tuberal y recientemente se demostró que existe una población neural que produce preproTRH y responde a la señal de saciedad de la leptina, también se ha propuesto que la TRH podría inhibir la secreción de péptidos orexigénicos (Carbone *et al.*, 2012).

En el hipotálamo anterior y el área preóptica observamos que la dieta alta en carbohidratos modificó el nivel de RNA mensajero de la TRH, incrementándolo a los 7 días en ambas regiones y disminuyéndolo a los 3 días sólo en el área preóptica. En el hipotálamo anterior también existen proyecciones neuronales de TRH. Se ha encontrado que daños en esta región resultan en obesidad, pero que sí los ratones obesos son tratados con inyecciones intraperitoneales de la TRH a largo plazo, se revierte el incremento de peso corporal (Pierpaoli y Leniskov, 2011). En estas zonas existen neuronas que responden a los cambios de temperatura. En trabajos previos del laboratorio, se demostró que el nivel de RNAm de la TRH se incrementa en una región que comprende el área preóptica y el hipotálamo anterior en ratas sometidas al frío, en forma similar a lo que ocurre en el NPV (Uribe *et al.*, 1993). Además, en el área preóptica el nivel de RNAm de TRH así como del receptor TRH-R1 se incrementa en ratas obesas por consumo de dieta

alta en grasa. Este incremento se ha relacionado con en el desarrollo de hipertensión arterial, ya que tratamientos con oligonucleótidos antisentido contra el preproTRH en esta región del hipotálamo, revierten el efecto sobre la presión arterial inducido por la dieta (García *et al.*, 1997; García y Pirola 2005; Landa *et al.*, 2007).

No encontramos cambios en el nivel de RNAm de la TRH en el hipotálamo posterior en respuesta a cambios en la dieta. Esta región comprende el núcleo dorsomedial y el ventromedial. Ambos núcleos se han relacionado con el mantenimiento de la homeostasis energética; el núcleo ventromedial se ha denominado centro de la saciedad. Tanto en éste núcleo como en el núcleo dorsomedial se han encontrado invaciones densas de neuronas TRHérgicas que ejercen efectos estimuladores sobre neuronas de éstos núcleos que probablemente también son neuronas sensibles a leptina (Wittmann *et al.*, 2009). Nuestros datos no revelan sensibilidad de las neuronas TRHérgicas de esta región a la inducción de la obesidad, pero queda la posibilidad de que efectos opuestos en cada núcleo hayan generado una aparente ausencia de respuesta.

En resumen, en varias zonas hipotalámicas analizadas encontramos que la biosíntesis de la TRH se modula en forma rápida y núcleo específico; además existe una respuesta diferencial al consumo de las diferentes dietas. Esto sugiere que muchos tipos de neuronas TRHérgicas del hipotálamo son sensibles a cambios en el balance energético. Es necesario analizar un número mayor de animales para poder hacer correlaciones que nos permitan sugerir que población TRHérgica esta involucrada con el cambio en el peso corporal, la termogénesis o sensando diferentes tipos de nutrientes.

Además, encontramos que la ingestión de dietas tipo cafetería afectó de manera muy específica el nivel de los RNA mensajeros de los receptores TRH-R1 y R2 en los núcleos donde logramos la semicuantificación, con un patrón diferente a lo observado con el nivel de RNAm de la TRH. Sólo se observó un incremento significativo en el mensajero de TRH-R1 en el HL del grupo que consumió dieta rica en grasa durante 7 días. Debido al poco material con el que contábamos, no



fue posible analizar todos los núcleos, por lo cual es necesario realizar nuevamente la cuantificación para completar el análisis. Experimentos realizados en hámster demuestran que el patrón de distribución del RNAm de el TRH-R1 es similar a la distribución hipotalámica observada en ratas, con la mayor densidad del RNAm del receptor en el hipotálamo lateral, seguida del NPV, área preóptica y el núcleo dorsomedial (Ebling *et al.*, 2008). Estos datos confirman que la separación del análisis por núcleos del hipotálamo posterior será relevante para refinar nuestros datos en el futuro. Finalmente estos autores no lograron realizar mediciones del RNAm de el TRH-R2 el cual no ha sido ampliamente identificado en el hipotálamo (Ebling *et al.*, 2008). El incremento en la expresión del RNAm de el TRH-R1 en respuesta a la dieta alta en grasa pudiera generar un aumento en los niveles del receptor en esta región y por lo tanto una capacidad aumentada de responder a la TRH. En esta región los receptores de la TRH están localizados sobre neuronas orexigénicas y sobre neuronas GABAérgicas que controlan a las neuronas de tipo hormona concentradora de melanina (MCH) (Zhang y Van den Pol, 2012). Todas estas neuronas controlan, entre otras funciones, el apetito y queda la posibilidad de que lo observado este relacionado al control del apetito por la TRH.

Contrario a los receptores, encontramos que el nivel de RNAm de la PPII cambió diferencial y significativamente en respuesta a las dietas hipercalóricas y en tiempos distintos. Por un lado, en el hipotálamo lateral y posterior observamos incrementos significativos en el grupo con dieta rica en carbohidratos después de 7 días de consumo, mientras que en el NPV el efecto ocurrió en el grupo con dieta rica en grasa. Además, se observó que en el hipotálamo lateral el nivel de RNAm de la PPII disminuyó transitoriamente al consumir la dieta rica en grasa por tres días. Estos cambios en la expresión de la PPII deberían traducirse en cambios en la actividad enzimática, por lo que se sugiere que la vida media de la TRH en el medio extracelular se verá alterada y por lo tanto la duración y/o intensidad de los efectos de la TRH. Recientemente se ha observado que los ratones nulos a la PPII tienen un menor peso con respecto a los ratones *wild type* (tipo silvestre o natural) (Tang *et al.*, 2010) lo que apoya que la participación de este elemento de la vía

TRHérgica en el control del peso corporal, quedando por definir como responden estos ratones al exponerlos a dietas hipercalóricas.

Estos resultados sobre la expresión de los receptores y la PPII junto con el análisis del mensajero de la TRH, sugieren que varios sistemas TRHérgicos del hipotálamo responden rápidamente y de forma núcleo específica en condiciones de alteración a la alta del balance energético. En particular, en respuesta a 7 días con dieta alta en grasa en el hipotálamo lateral, el incremento de la expresión de la TRH pudiera generar localmente un incremento de su secreción coordinado con un incremento de la cantidad de receptor y de la actividad de la PPII, lo que debería producir una potente señal TRHérgica, posiblemente anorexigénica. Podemos sugerir además, que el sistema TRHérgico del NPV responde al incremento en el consumo calórico independientemente de qué nutriente lo proporcione, mientras que el hipotálamo lateral sólo responde a mayor consumo de grasa. Esto es interesante ya que en ambas regiones las neuronas TRHérgicas responden a la leptina, la cual se incrementa en nuestro modelo, lo que implica que otras moléculas relacionadas con el nivel de insulina o glucosa pueden estar modulando la biosíntesis de la TRH en el NPV.

Obtuvimos datos preliminares que sugieren que las neuronas TRHérgicas hipotalámicas responden rápidamente y diferencialmente al balance energético positivo. Será necesario realizar más experimentos incrementando el número de animales, lo que nos permitirá realizar correlaciones e inferir qué tipos de neuronas TRHérgicas están respondiendo a cambios en los nutrientes de la dieta. Por otro lado, es interesante observar que los blancos hipotalámicos de la TRH también responden aunque en forma discreta, sugiriendo que la TRH tiene efecto sobre neuronas hipotalámicas en condiciones de alteración del balance energético en forma independiente de la activación del eje tiroideo.

## 14.- CONCLUSIONES

1.- Exponer a las ratas a un ambiente obesogénico por corto tiempo, modula a la alta el nivel de grasa corporal, insulina y leptina circulantes.

2.- La biosíntesis del RNAm de TRH en el NPV, se regula positivamente en forma rápida y transitoria en respuesta al consumo de dietas hipercalóricas.

3.- El consumo de dietas hipercalóricas por tiempos cortos, no modifica los niveles circulantes de TSH, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>.

4.- Varios parámetros que definen la intensidad de la comunicación TRHérgica son alterados rápidamente y de forma tejido específica en distintas zonas hipotalámicas, en respuesta a la ingestión de dietas ricas en carbohidratos o grasa

5.- Se sugiere que varios tipos de neuronas de TRH participan en los circuitos hipotalámicos que responden a cambios en el balance energético.

## 15.- PERSPECTIVAS

1.- Realizar una repetición de los experimentos en las mismas condiciones que nos permitan identificar cambios en el sistema TRHérgico así como hormonas relacionadas con el balance energético.

2.- Utilizar una técnica cuantitativa que confirmé los cambios obtenidos, como la RT-PCR en tiempo real que nos permita medir el nivel de los RNAm de las diferentes regiones hipotalámicas que se modifiquen en respuesta a esta condición.

3.- Definir que tipo de neuronas TRHérgicas responden a la inducción de la obesidad mediante la técnica de hibridación *in situ* de los elementos que se modifiquen de acuerdo a la RT-PCR en tiempo real.

## 16.- REFERENCIAS

Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H., Inui A. (2013). The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front in Neurosci.* (7):1-12. Doi 10.3389/fnins.2013.00051.

Ao, Y., Go, V.L., Toy, N., Li, T., Wang, Y., Song, M.K., Reeve, Jr. J., Liu, Y., Yang, H. (2006). Brainstem thyrotropin-releasing hormone regulates food intake through vagal-dependent cholinergic stimulation of ghrelin secretion. *Endocrinology.* 147(12): 6004–6010.

Arancibia, S., Rage, F., Astier, H., Tapia-Arancibia, L. (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology.* 64(4):257-67.

Araujo, R.L., Andrade, B.M., Padrón, A.S., Gaidhu, M.P., Perry, R.S., Carvalho, D.P., Ceddia, R.B. (2010). High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole body fat oxidation. *Endocrinology.* 151(7):3460-3469.

Balthasar, N. (2009). Feeding signals to the hungry mind. *Exp Physiol.* 94(8):857-66. doi: 10.1113/expphysiol.2008.042226

Barquera, S., Campirano, F., Bonvecchio, A., Hernández-Barrera, L., Rivera, J.A., Popkin, B.M. (2010). Caloric beverage consumption patterns in Mexican children. *Nutr J.* 21:9-47. doi: 10.1186/1475-2891-9-47.

Barquera, S., Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Pedroza-Tobías, A., Rivera-Dommarco, J.A. (2013). Prevalencia de obesidad en adultos mexicanos, ENSANUT 2012. *Salud Publica Mex;* (55) supl 2:S151-S160(a).

Barquera, S., Campos, I., Rivera, J.A. (2013). Mexico attempts to tackle obesity: the process, results, push backs and future challenges. *Obes Rev. Suppl* 2:69-78(b).

Barsona, JR., Karatayeva, O., Gaysinskayaa, V., Chang, C.Q., Leibowitza, S.F. (2012). Effect of dietary fatty acid composition on food intake, triglycerides, and hypothalamic peptides. *Regul Pept.* 173 (1-3): 13–20. doi: 10.1016/j.regpep.2011.08.012.

Berthoud, H.R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev.* 26(4):393-428.

Berthoud, H.R. (2004). Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol Behav.* 81(5):781-93.

Berthoud, H., Morrison, C. (2008).The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol.* 59:55-92.

Bianco, A.C., McAninch, E.A. (2013). The role of thyroid hormone and brown adipose tissue in energy homeostasis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 1(3): 250–58. doi: 10.1016/S2213-8587(13)70069-X.

Bjørndal, B., Burri, L., Staalesen, V., Skorve, J., Berge, R.K. (2011). Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes.* 2011:1-15. doi: 10.1155/2011/490650.

Blouet, C., Schwartz, G.J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Research.* 209(1): 1–12. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.024.

Burgueño, A., Landa, M.S., Schuman, M.L., Alvarez, A.L., Carabellii, J., García, S.I., Pirola, C.J. (2007). Association between diencephalic thyroliberin and arterial blood pressure in agouti-yellow and ob/ob mice may be mediated by leptin. *Met Clin. Exp* 56:1439-1443.

Cannon, B., Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84(1):277-359.

Cannon, C.P., Kumar, A. (2009). Treatment of overweight and obesity lifestyle, pharmacologic and surgical options. *Clinical Cornerstone.* 9(4):55-71.

Carbone, D.L., Zuloaga, D.G., Lacagnina, A.F., Handa, R.J. (2012). Prepro-thyrotropin releasing hormone expressing neurons in the juxtaparaventricular region of the lateral hypothalamus are activated by leptin and altered by prenatal glucocorticoid exposure. *Brain Res.* 1477:19-26. doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.020.

Caricilli, A.M., Penteadó, E., Abreu, L., Quaresma, P., Santos, A.C., Guadagnini, D., Razolli, D. Mittestainer, F.C., Carvalheira, J.B., Velloso, L. A., Saad, M.J., Prada, P.O. (2012). Topiramate treatment improves hypothalamic insulin and leptin signaling and action and reduces obesity in mice. *Endocrinology.* 153(9):4401-4411. doi: 10.1210/en.2012-1272.

Cinti, S., Frederich, R.C., Zingaretti, M.C., De Matteis, R., Flier, J.S., Lowell, B.B. (1997). Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology.* 138(2):797-804.

Coenen, K.R., Gruen, M.L., Chait, A., Hasty, A.H. (2007). Diet-Induced increases in adiposity, but not plasma lipids, promote macrophage infiltration into white adipose tissue. *Diabetes.* 56(3):564-573.

Coppola, A., Hughes, J., Esposito, E., Schiavo, L., Meli, R., Diano, S. (2005). Suppression of hypothalamic deiodinase tyrell activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett.* 579(21):4654-4658.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411(6836): 480-484

Choi, Y.H., Hartzell, D., Azain, M.J., Baile, C.A. (2002). TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav.* 77:1-4.

Chomczynski., Sacchi. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate – phenol –chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156–159

Dallman, M.F., La Fleur, S., Pecoraro, N.C., Gomez, F., Houshyar, H., AKANA, S.F. (2004). Minireview: glucocorticoids—food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology.* 145(6):2633–2638.

Danielson P.E., Forss-Petter S., Brow M.A., Calavetta L., Douglass J., Milner R.J., Sutcliffe J.G. (1988). p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 7 (4):261-267.

De la Peña P., Delgado L.M., del Camino D., Barros F. (1992) Cloning and expression of the thyrotropinreleasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells. *Biochem J*; 284 (PT 3):891-899.

Deldin, A.R., Lee, S. (2013). Role of physical activity in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents. *Appl Physiol Nutr Metab.* 38(8):805-12.

DeWald, T., Khaodhiar, L., Donahue, M.P., Blackburn, G. (2006). Pharmacological and surgical treatments for obesity. *Am Heart J.* 151:604 - 24.

Ebling, F.J., Wilson, D., Wood, J., Hughes, D., Mercer, J.G., Morgan, P.J., Barrett, P. (2008). The thyrotropin-releasing hormone secretory system in the hypothalamus of the siberian hamster in long and short photoperiods. *J Neuroendocrinol.* 20(5):576–586.

Elmqvist, J.K., Elias, C.F., Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron.* 22(2):221–232.

Elmqvist, J.K. (2001). Hypothalamic pathways underlying the endocrine, autonomic, and behavioral effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 25 Suppl 5:S78-82

ENSANUT. (2012) Encuesta Nacional de salud y nutrición. Capítulo 2, pag. 126-195.

Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Huang, Q.H., Tatro, J.B., Rand, W.M., Emerson, C.H., Lechan, R.M. (2000). Alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci.* 20(4):1550-1558(a).

Fekete, C., Milhaky, E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen, J.T., Mao, Q., Rand, W.M., Moss, L.G., Emerson, C.H., Jackson, I.M.D., Lechan, R.M. (2000). Association of cocaine and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci.* 20:9224-9234(b).

Fekete, C., Kelly, J., Mihaly, E., Sarkar, S., Rand, W.M., Legradi, G., Emerson, C., Lechan, R. (2001). Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology.* 142(6): 2606-2613.

Fekete, C., Kelly, J., Sarkar, S., Rand, W.M., Harney, J., Emerson, C., Bianco, A.C., Beck-Sickinger, R., Lechan, R. (2002). Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology.* 143 (12): 4513-4519.

Fekete, C., Singru, P., Sarkar, S., Rand, W.M., Lechan, M. (2005). Ascending brainstem pathways are not involved in lipopolysaccharide-induced suppression of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 146(3):1357-1363.

Fekete, C., Singru, P., Sanchez, E., Sarkar, S., Christoffolete, M.A., Riberio, R.S., Rand, W.M., Emerson, C.H., Bianco, A.C., Lechan, R.M. (2006). Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology.* 147(1): 520–529.

Fernández-Quintela, A., Churrua, I., Portillo, M.P. (2007). The role of dietary fat in adipose tissue metabolism. *Public Health Nutr.* 10(10 A):1126-1131.

Frühbeck, G., Becerril, S., Sáinz, N., Garrastachu, P., García-Veloso, M.J. (2009). BAT: a new target for human obesity? *Trends Pharmacol Sci.* 30(8):387-396. doi: 10.1016/j.tips.2009.05.003.

García, S.I., Porto, P.I., Alvarez, A.L., Martinez, V.N., Shaurli, D., Finkielman, S., Pirola, C.J. (1997). Central overexpression of the TRH precursor gene induces hypertension in rats: antisense reversal. *Hypertension.* 30(3 Pt 2): 759-66.

Garcia, S.I., Pirola, C. (2005). Thyrotropin-releasing hormone in cardiovascular pathophysiology. *Regul Pept.* 128(3): 239-246.

Gomes-Tofolo, L.P., Rinaldi, W., Scomparin, D.X., Grassioli, S., Barella, L.F., De Oliveira, J.C., Branco, R.C., Agostinho, A.R., Ribero, T.A., Gravena, C., Mathias, P.C. (2013). Moderate exercise restores pancreatic beta-cell function and autonomic nervous system activity in obese rats induced by high-fat diet. *Cell Physiol Biochem.* 32(2):310-321. doi: 10.1159/000354439.

Guo, F., Bakal, K., Minokoshi, Y., Hollenberg, A.N. (2004). Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology.* 145(5): 2221-2227.

Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Dalkin, A.C., Yasin, M., Marshall, J.C. (1992). Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology.* 130(5): 2917-2923.

Hansen, J.C., Gilman, A.P., Odland, J.O. (2010). Is thermogenesis a significant causal factor in preventing the “globesity” epidemic? *Med Hypotheses.* 75 (2): 250–256. doi: 10.1016/j.mehy.2010.02.033.

Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C.F., Chandrankunnel, A., Nillni, E.A., Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Flier, J.S., Hollenberg, A.N. (2001). Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest.* 107(1):111-120.

Heuer, H., Schafer, M.K., O’Donnell, D., Walker, P., Bauer, K. (2000). Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol.* 428(2):319-36.

Himms-Hagen, J. (1990). Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J.* 4(11) : 2890-2898.

Horvath, T.L., Diano, S., Tscöp, M. (2004). Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscien* 10(3):235-246.

Ingalls, A. M., Dickie, M. M., Snell, G. D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41(12): 317-318.

Jensen, K.J., Alpini, G., Glaser, S. (2013). Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Compr Physiol.* 3(2): 655–665. doi: 10.1002/cphy.c120018.

Joseph-Bravo, P., De Gortari, P. (2007). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Bioteconología.* 14:65-76.

Kakucska, I., Qi, Y., Lechan, R.M. (1995). Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 136(7): 2795-2802.

Kanasaki, K., Koya, D. (2011). Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol.* 197636:1-11. doi: 10.1155/2011/197636.

Kopelman, Peter. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature.* 404:635-643.

Kennet, G.A., Clifton, P.G. (2010). New approaches to the pharmacological treatment of obesity: can they break through the efficacy barrier? *Pharmacol Biochem and Behav.* 97(1): 63–83. doi: 10.1016/j.pbb.2010.07.020

- Lam, T.K. (2010). Neuronal regulation of homeostasis by nutrient sensing. *Nat Med.* 16(4): 392-395. doi: 10.1038/nm0410-392.
- Landa, M.S., García, S.I., Schuman, M.L., Burgueño, A., Alvarez, A.L., Saravia, F.E., Gemma, C., Pirola, C.J.(2007). Knocking down the diencephalic thyrotropin-releasing hormone precursor gene normalizes obesity-induced hypertension in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(5):1388-1394.
- Lee, N.M., Carter, A., Owen, N., Hall, W. (2012). The neurobiology of overeating. Treating overweight individuals should make use of neuroscience research, but not at the expense of population approaches to diet and lifestyle. *EMBO Rep.* 13(9):785-790.
- Lechan, R.M., Wu P., Jackson I.M.D., Wolfe H., Cooperman S., Mandel G., Goodman R.H. (1986a). Thyrotropin releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*; 231: 159-161.
- Lechan, R.M., Csaba, Fekete.C. (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res.* 153, 209-235.
- Leininger, G.M. (2011). Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via lateral hypothalamus. *Physiol Behav.* 104(4): 572-581. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.060.
- Legradi, G., Emerson, C.H., Ahima, R.S., Flier, J.S., Lechan, R.M. (1997). Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 138(6):2569-2576.
- Lenard, N.R., Berthoud, H.R. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity.* 16 Suppl 3:S11-22. doi: 10.1038/oby.2008.511.
- Lottenberg, A. M., Da Silva, A. M., Ferrari, M. S., Marcondes, M. R., Nakandakare, E. R. (2012). The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 23(9):1027–1040. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.03.004.
- Ludwig, D.S. (2000). Dietary glycemic index and obesity. *J Nutr.* 2000; 130:280S–283S.
- Lutz, T.A., Woods, S.C. (2012). Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol.* Chapter 5: Unit 5.61 pag.1-20.
- Masek, J., Fabry, P. (1959). High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia.* 15; 15: 444-445.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., Hill, R.A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 26(11):1407–1433.
- Melhorn, S.J., Krause, E.G., Scott, K.A., Mooney, M.R., Johnson, J.D., Woods, S.C., Sakai, R.R. (2010). Acute exposure to a high-fat diet alters meal patterns and body composition. *Physiology Behav.* 99(1): 33–39
- Moinat, M., Deng, Ch., Muzzin, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., Dulloo, A.G., Giacobino, J.P. (1995). Modulation of *obese* gene expression in rat brown and white adipose tissues. *FEBS Lett.* 373(2):131-134.
- Monteiro, M.P. (2011). Anti-ghrelin vaccine for obesity: a feasible alternative to dieting? *Expert Rev Vaccines.* 10(10):1363–1365. doi: 10.1586/erv.11.115.
- Monteiro, M.P. (2013). Obesity vaccines. *Hum Vaccin Immunother.* 10(4).



- Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E.B., Willet, W.C., Hu, F. (2011). Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med.* 364(25):2392-2404. doi: 10.1056/NEJMoa1014296.
- Myers, M., Olson, D. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature.* 491(7424): 357-363. doi: 10.1038/nature11705.
- Nilni, E.A. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Neuroendocrinol.* 31(2):134–156. doi: 10.1016/j.yfrne.2010.01.001.
- Oscai, L.B., Miller, W.C., Arnal, D.A. (1987). Effects of dietary sugar and of dietary fat on food intake and body fat content in rats. *Growth.* 51(1):64–73.
- Ovaskainen, M.L., Reinivuo, H., Tapanainen, H., Hannila, M.L., Korhonen, T., Pakkala, H. (2006). Snacks as an element of energy intake and food consumption. *Eur J Clin Nutr.* 60(4): 494–501.
- Palkovits, M., Brownstein, M. (1988). Maps and guide to microdissection of the rat brain. *Elsevier Science Publishing Co. Inc.*
- Perello, M., Cakir, I., Cyer, N.E., Romero, A., Stuart, R.C., Chiappini, F., Hollenberg, A.N., Nilni, E.A. (2010). Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299(6):E976-E989. doi: 10.1152/ajpendo.00448.2010.
- Perpaoli, W., Leniskov, V.A. (2011). Effects of long-term intraperitoneal injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on aging- and obesity-related changes in body weight, lipid metabolism, and thyroid functions. *Curr Aging Sci.* 4(1): 25-32.
- Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., Lamantia, A. S., Macnamara, J. O., [...]. 3 ed. "Neuroscience". Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., (2004). p. 14-16, 18.
- Ramírez, E.C. (2006). Regulación de la actividad TRHérgica en el sistema nervioso central de la rata durante el ejercicio voluntario. (Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias-UNAM).
- Remmers, F., Delemarre-van, De Waal, H.A. (2011). Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. *Endocr Rev.* 32(2):272-311. doi: 10.1210/er.2009-0028.
- Rodríguez, E., Ribot, J., Rodríguez, A.M., Palou, A. (2004). PPAR-gamma2 expression in response to cafeteria diet: gender-and depot-specific effects. *Obes Res.* 12(9): 1455-1463.
- Sánchez, E., Vargas, M.A., Singru, P.S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli J.L., Lechan, R.M., (2009). Tanycyte pyroglutamylyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 50(5):2283-2291. doi: 10.1210/en.2008-1643
- Sclafani, A. (1987). Carbohydrate taste, appetite, and obesity: an overview. *Neurosci Biobehav Rev.* 11(2): 131–153.
- Segerson, T.P., Kauer, J., Wolfe, H.C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I.M., Lechan, R.M.(1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 238(4823):78-80.
- Seufert, J., Kieffer, T.J., Habener. (1999). Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(2):674–679.

Silva, J.E. (2006). Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev.* 86(2): 435–464.

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

Schauder B., Schomburg L., Kohrle J., Bauer K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci.* 91(20): 9534-9538.

Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., Baskin, D.G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 98(5):1101–1106.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R., Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature.* 404(6778):661-671.

Stock, M.J., Rothwell, N.J. (1981). Sympathetic control of brown adipose tissue in the regulation of body weight. *Biochem Soc Trans.* 9(6):525-7.

Tang, T., Tang, J., Li, Y., Lin, W.Y., Martin, F., Grant, D., (2010). A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat Biotechnol.* 28(7): 749-55. doi: 10.1038/nbt.1644

Taylor, J.R., Dietrich, E., Powell, J.G. (2013). New and emerging pharmacologic therapies for type 2 diabetes, dyslipidemia, and obesity. *Clin Ther.* 35(1): A3-A17. doi: 10.1016/j.clinthera.2012.

Tsukita, S., Yamada, T., Uno, K., Takahashi, K., Kaneko, K., Ishigaki, Y., Imai, J., Hasegawa, Y., Sawada, S., Ishihara, H., Oka, Y., Katagiri, H. (2012). Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals. *Cell Metab.* 16(6):825–832. doi: 10.1016/j.cmet

Uribe, R.M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Cols. (1991). Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology.* 54(5):493-498.

Uribe, R.M., Redondo, J.L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P. (1993). Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 58(1):140-145.

Uribe, R.M., Zacarías, M., Corkidi, G., Cisneros, M., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P. (2009). 17 $\beta$ -Oestradiol indirectly inhibits thyrotrophin-releasing hormone expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of female rats and blunts thyroid axis response to cold exposure. *J Neuroendocrinol.* 21(5):439-448. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01861.x.

Uribe, R.M., James-Hoy, L., Ramirez-Martinez, C., Garcia, R. F., Cisneros, M., Cote-Velez, A., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P. (2014). Voluntary exercise adapts the hypothalamuspituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology.* 155(5):2020-30. doi: 10.1210/en.2013-1724.

Van, G.A., Van, T. H., Klootwijk, W., Handler, B., Linkels, E., Van, S. P., Van, O. J., De Jong, F.H., Visser, T.J., De Greef, W.J. (1996). Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotrophin secretion during lactation. *J Endocrinol.* 148(2): 325-336.

Vickers, S.P., Jackson, H.C., Cheetham, S.C. (2011). The utility of animal models to evaluate novel anti-obesity agents. *Br J of Pharmacol.* 164(4): 1248–1262. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01245.x.

Volkow, N.D., Wang, G.J., Tomasi, D., Baler, R.D. (2013). Obesity and addiction: neurobiological overlaps. *Obesity rev.* 14(1): 2–18. doi: 10.1111/j.1467-789X.2012.01031.x

Wittmann, G., Füzési, T., Liposits, Z., Lechan, R.M., Fekete, C. (2009). Distribution and axonal projections of neurons coexpressing thyrotropin-releasing hormone and urocortin 3 in the rat brain.

*J Com Neurol.* 517(6): 825-840. doi: 10.1002/cne.22180.

Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S. (2005). Appetite control. *J Endocrinol.* 184:291-318.

Yoshioka, K., Yoshida, T., Kondo, M. (1992). Brown adipose tissue thermogenesis and metabolic rate contribute to the variation in obesity among rats fed a high fat diet. *Jpn J Physiol.* 42(4):673-680.

Zhang, X., van den Pol A.N. (2012). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) inhibits melanin-concentrating hormone neurons: implications for TRH-mediated anorexic and arousal actions. *J Neurosci.* 32:3032-43.

Zhao, K., Ao, Y., Harper, R.M., Go, L.W., Yang, H. (2013). Food-Intake dysregulation in Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki Rats: hypothesized role of dysfunctional brainstem thyrotropin-releasing hormone and impaired vagal output. *Neuroscience.* 247:43-54. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.017

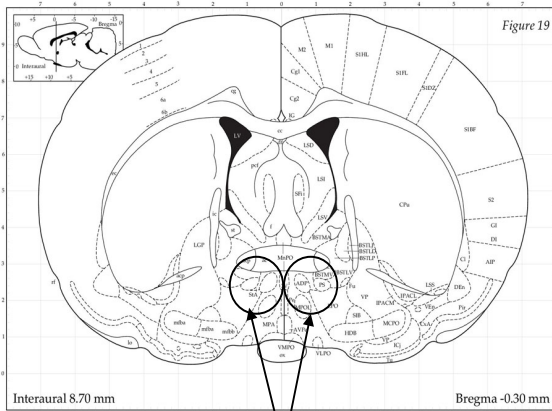
Zheng, H., Berthoud, H.R. (2008). Neural systems controlling the drive to eat: mind versus metabolism. *Physiology (Bethesda).* 23:75-83. doi: 10.1152/physiol.00047.2007.

Zoeller, R.T., Kabeer, N., Albers, H.E. (1990). Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology.* 127(6): 2955-2962.

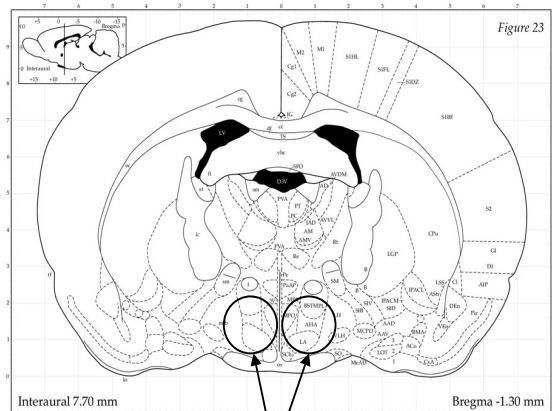
Zorrilla, E.P., Iwasaki, S., Moss, J.A., Chang, J., Otsuj, J., Inoue, K., Meijler, M., Janda, K.D. (2006). Vaccination against weight gain. *PNAS.* 103(35): 13226-1323.

## 16.- ANEXOS

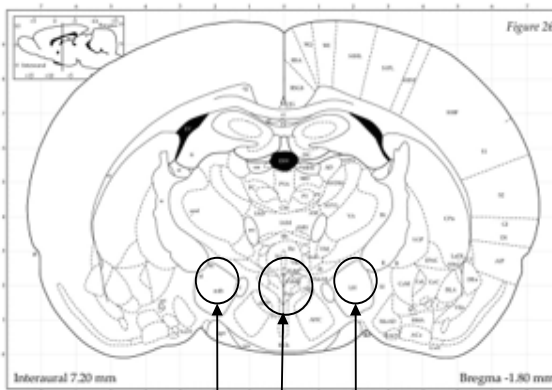
### 1) Diagrama de disecciones.



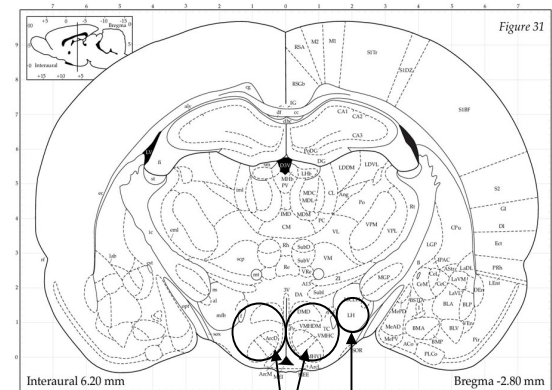
Área preóptica



Hipotálamo anterior



Hipotálamo lateral  
Núcleo paraventricular  
Hipotálamo lateral



Hipotálamo lateral posterior

Anexo 1. Diagrama de disecciones. Se muestran imágenes representativas de las posiciones de los sacabocados utilizados para la disección de las zonas hipotalámicas. Los cortes corresponden a los siguientes bregmas de acuerdo al núcleo a disectar: AP bregma-.030mm, HA bregma-1.30mm, NPV y HL bregma-1.80mm y el HP bregma-2.80mm.

2) Tabla de las secuencias de los oligonucleótidos estudiados y control.

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
TRH Lechan et al., 1986b	(5'-3'): GGACCTTGGTTGCTGTCGACTCTGGCTTTG	(5'-3'): ATGACTCCTGCTCAGGTCATCTAGAAGCT
TRH-R1 De la Peña et al., 1992	(5'-3'): ACCCAGAGAAGCAGGCAGCGTGACA	(5'-3'): GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG
TRH-R2 Cao et al., 1998	(5'-3'): GTCTTCCTAGTGCTCCTGGTGTG	(5'-3'): CCAGCAAGGGTCCGATGAAAAAG
PPII Shauder et al., 1994	(5'-3'): GGACACCCAAATAATTGCT	(5'-3'): CTGGATCGCATACAAAAAG
Ciclofilina Danielson et al., 1988	(5'-3'): GGGGAGAAAGGATTTGGCTA	(5'-3'): ACATGCTTGCCATCCAGCC

Anexo 2. Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos que fueron sintetizados en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología, UNAM.

2.1) Tabla de los volúmenes de cDNA utilizados para la PCR así como número de ciclos de PCR y Tma para cada región hipotalámica.

Región cDNA	HA			HL			HP			NPV			AP		
	ul	ciclos	Tma	ul	ciclos	Tma	ul	ciclos	Tma	ul	ciclos	Tma	ul	ciclos	Tma
TRH	3	25	64	3	26	64	3	25	64	3	24	64	2	25	64
TRH-R1	—	—	—	3	31	69	3	31	69	3	30	69	—	—	—
TRH-R2	—	—	—	3	33	69	5	32	69	3	33	69	—	—	—
PPII	3	31	55	3	31;33	55	3	31;33	55	4	31	55	—	—	—
CICLO	3	20	64	3	20	64	3	20	64	3	20	64	3	20	64

Anexo 2.1. Tabla 2. Volúmenes de cDNA, números de ciclos de PCR y Temperatura de apareamiento (TMa). Para la determinación de los RNA mensajeros específicos, se realizó la reacción de síntesis de cDNA con transcriptasa reversa (RT), el cual se utilizó en las PCR de punto final. Para este procedimiento, realizamos varias pruebas para identificar los volúmenes (ul) de cDNA requeridos para una PCR exitosa para cada región. Se muestran los ciclos de amplificación y la Tma específicos de acuerdo al gen y a la región hipotalámica.

3) Tabla complementaría de la técnica de radioinmunoensayo (RIA) para la corticosterona (B), TSH, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>.

RIA	CPM totales	NSB unión no específica	B0	Muestras	Amortiguador para RIA
Corticosterona (B)	100µl B-H <sup>3</sup> (10,000 cpm)	100µl B-H <sup>3</sup> 600µl buffer RIA	100µl B-H <sup>3</sup> 500µl buffer RIA 100µl anticuerpo anti-B (1:1,200)	500µl suero (1:500) desnaturalizado a 98° por 10min 100µl B-H I <sup>3</sup> 100µl anticuerpo anti-B (1:1,200)	10mM PO <sub>4</sub> pH 7.5 150nM NaCl 0.1% Gelatina de piel de becerro
TSH	100µl TSH-I <sup>125</sup> (10,000 cpm)	100µl TSH-I <sup>125</sup> 300µl buffer RIA	100µl TSH -I <sup>125</sup> 200µl buffer RIA 100µl anticuerpo anti-TSH (1:375,000)	50µl suero 100µl TSH -I <sup>125</sup> 100µl anticuerpo anti-TSH (1:375,000) 50µl buffer RIA	50mM PO <sub>4</sub> pH 7.5 150nM NaCl 1% BSA 50mM EDTA
T <sub>3</sub>	1,000µl T3-I <sup>125</sup> (10,000 cpm)	1,000µl T3-I <sup>125</sup> 100µl buffer RIA	1,000µl T3 -I <sup>125</sup> 100µl buffer RIA Tubos con Ac	100µl suero 100µl T3 -I <sup>125</sup> Tubos con Ac	Buffer de suero humano
T <sub>4</sub>	1,000µl T4-I <sup>125</sup> (10,000 cpm)	1,000µl T4-I <sup>125</sup> 100µl buffer RIA	1,000µl T4 -I <sup>125</sup> 100µl buffer RIA Tubos con Ac	25µl suero 100µl T4 -I <sup>125</sup> Tubos con Ac	Buffer de suero humano

Anexo 3. Tabla 2. Tabla complementaría de la técnica de radioinmunoensayo. La técnica de radioinmunoensayo se realizó para la corticosterona (B), TSH, T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>. Se muestran las cuentas por minuto (cpm) totales utilizadas en cada tubo o pozo y el tipo de hormona radioactiva utilizada como trazador. También se muestra la descripción del blanco de calibrado (NSB o unión no específica para cada hormona) así como las especificaciones para el tratamiento de cada muestra y su respectivo amortiguador.