



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA DE
CAFETERÍA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS
TIROIDEAS EN UN MODELO ANIMAL

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA:
CORTÉS MONTOYA VANESSA

DIRECTOR: DR. JAIME HÉCTOR GÓMEZ ZAMUDIO
ASESOR: M. en C. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA



MÉXICO, Ciudad de México

11 de SEPTIEMBRE del 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

EFFECTO DE LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA DE
CAFETERÍA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES
INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS
TIROIDEAS EN UN MODELO ANIMAL

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA:
CORTÉS MONTOYA VANESSA

DIRECTOR: DR. JAIME HÉCTOR GÓMEZ ZAMUDIO
ASESOR: M. en C. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA



MÉXICO, Ciudad de México

11 de SEPTIEMBRE del 2017

La frase más excitante que se puede oír en ciencia, la que anuncia nuevos descubrimientos, no es ¡EUREKA! (¡lo encontré!) sino “Es extraño...”.

(Isaac Asimov)

Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad.

(Karl Popper)

Lo importante es no dejar de hacerse preguntas. La curiosidad tiene su propia razón de ser.

(Albert Einstein)

DEDICATORIA

A mis padres Lucía y Sergio por siempre estar a mi lado apoyando e incitándome a seguir con mis sueños y cumplir mis deseos, los amo. Gracias por demostrarme que todo es posible que solamente requieres trabajar para alcanzarlo. Por hablarme directamente y ser mis consejeros de vida. No sé qué no agradecer pues todo me ha ayudado y sé que me seguirá sirviendo a lo largo de mi vida.

A Antonio gracias amor por ayudarme a descubrir mis fortalezas, por escucharme todo el tiempo, por la mejora continua mutua, por compartir tus sentimientos y tu vida conmigo durante estos años. Eres la persona más sincera, inteligente y sin maldad que nunca haya conocido.

A Zyanya por ser mi inspiración para lograr todas mis metas y crear nuevas, por estar siempre en mi corazón y sobre todo por darme la fuerza para luchar. Esto es para ti, nos volveremos a encontrar TE AMOOOO.

A Gabriel por tu curiosidad, por hacerme travesuras y cuidarme en algunos de mis desvelos, te quiero mucho.

A mis abuelos Esperanza y Tranquilino, por bríndame su amor, ternura, cuidados y por siempre tener un consejo o una palabra reconfortante para mí.

A toda mi familia Cris, Cire, Camerino, Fanny, Alan, Ángel, Mora, al Gruñis (Ion) y mis hermanos particularmente a Adriana y Arturo, por contribuir con sus experiencias y ser parte de mi formación.

A Jenny por tu amistad durante tantos años por escucharme además de siempre bríndame un consejo y una sonrisa te quiero.

A Patricia Fragoso y a Carlos Dueñas† por ser tan lindos conmigo.

Para todos aquellos que me apoyaron y me ayudaron a crecer.



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Jaime H. Gómez Zamudio por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto, compartirme el entusiasmo de seguir investigando y seguir formulando más preguntas, por su apoyo, los consejos y porque no por ser malvado a su muy divertido estilo.

A la Dra. Martha L. Lázaro por contribuir a mi formación en este proyecto, su apoyo y los detalles que tuvo, ustedes dos son una gran inspiración para mí por todo lo bueno que me enseñaron académica y personalmente gracias. También a Matías por sus nave espacial y travesuras.

A Ángeles, Gloria, Miriam, Ana y Blanca por ser mis amigas durante esta etapa, por las desveladas, el conocimiento y su amistad, me llevo muchas cosas de ustedes no sólo la comida.

Por supuesto a Arturo por su amistad y sacarnos una sonrisa con su peculiar pregunta

A todo el equipo de trabajo de la UIMB, Dr. Fernando, Dr. Adán, M.en C. Martha Sánchez por aportar a mi formación. A todos los compañeros que conocí aquí Rafa, Diego, Ere, Sarahí, Luis, Aldo y a todos los que conocí por hacer mi estancia más agradable y darme distintas perspectivas.

Al Bioterio del CMN SXXI IMSS, por prestarme las instalaciones para el cuidado de los animales y realizar esta investigación. A la Veterinaria Inés por su asesoramiento.

A mis sinodales: Dr. Rodrigo Aníbal Mateos Nava, Mtra. Yolanda Flores Cabrera, M.en C. Leonor Aguilar Santellises, Q.F.B. María del Pilar Cedillo Martínez por la revisión y retroalimentación brindada para este trabajo.

A todos los profesores que conocí por el conocimiento brindado, las experiencias y los consejos que obtuve de ellos, Dr. Arturo Marroquín, Dr. Luis Mora, I.Q. Francisco J. Mandujano, Dra. Raquel Retana Ugalde entre otros, además de ser un ejemplo de hacia dónde me quiero dirigir.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer a la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica del hospital de especialidades Bernardo Sepúlveda Siglo XXI, IMSS, por darme la oportunidad de participar en este proyecto y brindarme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones.

Al Dr. Miguel Cruz López Jefe de la UIMB por permitirme colaborar en ella.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM por brindarme los conocimientos para mi formación académica, de igual manera a la carrera de Q.F.B.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	VII
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 OBESIDAD Y ENFERMEDAD TIROIDEA	3
2.2 GLÁNDULA TIROIDES.....	6
2.2.1 HORMONAS TIROIDEAS	7
2.2.2 BIOSÍNTESIS HORMONAS TIROIDEAS.....	8
a) FORMACIÓN DE LA TIROGLOBULINA (Tg)	9
b) CAPTACIÓN Y LIBERACIÓN DE YODURO.....	10
c) OXIDACIÓN Y ORGANIFICACIÓN	10
d) ACOPLAMIENTO.....	11
e) SECRECIÓN	11
f) DESYODACIÓN.....	14
2.2.1 FOSFODIESTERASA (PDE).....	15
.....	16
2.3 ENFERMEDADES TIROIDEAS	16
2.4 RELACIÓN ENTRE TSH, HORMONAS TIROIDEAS Y LA OBESIDAD.....	19
2.5 DIETA DE CAFETERÍA	22
2.6 CAMBIOS DE TSH-R, NIS Y PDE8B EN LA OBESIDAD.....	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
4. HIPÓTESIS.....	26
5. OBJETIVOS.....	26
• OBJETIVO GENERAL	26
• OBJETIVOS PARTICULARES	26
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
6.1 TIPO DE ESTUDIO	27
6.2 LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO	27
6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN	27
6.4 MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.4.1 Sujetos de estudio.....	27
6.4.2 Dieta	28
6.4.3 Disección.....	28

6.4.4	ELISA	29
6.4.5	Extracción de RNA.....	30
6.4.6	Electroforesis	31
6.4.7	Cuantificación	32
6.4.8	Tratamiento con DNasa.....	32
6.4.9	RT-PCR	32
6.4.9.1	cDNA.....	32
6.4.9.2	PCR Tiempo Real.....	33
6.4.10	Incubación de explantes de tiroides con TSH.....	34
6.4.11	Cálculo para la determinación de la expresión relativa	35
6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
6.6	DIAGRAMA DE FLUJO	36
6.7	VARIABLE	37
7.	RESULTADOS	38
7.1	CONSUMO ENERGÉTICO	38
7.2	DATOS MORFOMÉTRICOS	41
7.3	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA TIROIDES.....	43
7.4	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	44
7.5	CONCENTRACIÓN SERICA DE TSH (ELISA).....	47
7.6	CORRELACIÓN ENTRE [TSH]-PESO Y [TSH]-IMC EN EL GRUPO DE DIETA DE CAFETERÍA	48
7.7	EXPRESIÓN GÉNICA	49
7.7.1	Expresión del receptor de TSH (TSHR).....	49
7.7.2	Expresión del simportador de Na/I (NIS)	50
7.7.3	Expresión de la fosfodiesterasa 8B (PDE8B)	50
7.8	CAMBIOS EN LA EXPRESION DE EXPLANTES DE TIROIDES INCUBADOS CON TSH	51
7.8.1	EXPRESIÓN TSHR <i>in vitro</i>	51
7.8.2	EXPRESIÓN NIS <i>in vitro</i>	52
7.8.3	EXPRESIÓN PDE8B <i>In vitro</i>	53
8.	DISCUSIÓN	54
8.1	CONSUMO ENERGÉTICO Y DATOS MORFOMÉTRICOS	54
8.2	TAMAÑO DE TIROIDES	57
8.3	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	57
8.4	CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TSH	59
8.5	EXPRESIÓN GÉNICA DE TSHR, NIS, PDE8B	60
9.	CONCLUSIONES	63
10.	PERSPECTIVAS	64
11.	ANEXOS	65
11.1	CONSUMO ENERGÉTICO	65
11.2	EXPRESIÓN GÉNICA EXPLANTES TIROIDEOS.....	67
12.	REFERENCIAS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años de edad, en la ENSANUT 2012 y 2016 por sexo ³	3
Fig. 2 Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 20 años de edad, en la ENSANUT 2012 y 2016 por sexo ³	4
Fig. 3 A. Posición e Irrigación glándula tiroides. B. Esquema glándula tiroides. C. Micrografía (250X) de la glándula tiroides, cada folículo consiste de varios tirocitos que rodean al coloide ^{9,10} ..	6
Fig. 4 Estructura de las hormonas tiroideas.....	8
Fig. 5 Receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR) ¹⁷	9
Fig. 6 Síntesis de las hormonas tiroideas ^{11,20}	13
Fig. 7 Desyodación de las hormonas tiroideas ¹¹	14
Fig. 8 Familia de fosfodiesterasas (PDE's) ²²	16
Fig. 9 Teorías sobre el aumento de TSH en la obesidad ⁴¹	21
Fig. 10 Diagrama de flujo.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Test de tamizaje de la función tiroidea ^{26,29}	18
Tabla 2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para los animales utilizados.	27
Tabla 3 Condiciones cDNA; Se utiliza la reacción de la transcriptasa reversa para obtener cDNA a partir de RNA.....	33
Tabla 4 Secuencia de cebadores; se utilizó como gen de referencia (Housekeeping) a β -Act para evaluar la expresión de TSHR, NIS y PDE8B.	33
Tabla 5 Condiciones de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa); para cuantificar la expresión relativa de RNA se utilizó la PCR en tiempo real.....	34
Tabla 6 Variables independientes y dependientes de los experimentos a realizar.....	37

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1 Electroforesis de RNA.	31
Fotografía 2 Tiroides grupo control.	43
Fotografía 3 Tiroides grupo dieta de cafetería.....	43

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráf.1 Ingesta semanal de alimento.....	38
Gráf.2 Ingesta semanal de dieta estándar.....	38
Gráf.3 Consumo de agua.....	39
Gráf.4 Consumo energético total.....	39
Gráf.5 Carbohidratos.....	40
Gráf.6 Lípidos.....	40
Gráf.7 Proteínas.....	41
Gráf.8 Peso corporal.....	42
Gráf.9 IMC.....	42
Gráf.10 Diámetro abdominal.....	42
Gráf.11 Tamaño lobulos tiroideos.....	44
Gráf.12 Parametros bioquimicos.....	45
Gráf.13 Glucosa.....	45
Gráf.14 Creatinina.....	46
Gráf.15 Parametros enzimaticos.....	47
Gráf.16 Concentración de TSH.....	47
Gráf.17 Corelación de TSH ng/mL-IMC DCAF.....	48
Gráf.18 Corelación de TSH ng/mL-peso DCAF.....	48
Gráf.19 Expresión de <i>TSHR</i>	49
Gráf.20 Expresión de <i>NIS</i>	50
Gráf.21 Expresión de <i>PD8B</i>	51
Gráf.22 Expresión de <i>TSHR</i> (Explantes) grupo control.....	52
Gráf.23 Expresión de <i>TSHR</i> (Explantes) grupo de cafetería.....	52
Gráf.24 Expresión de <i>NIS</i> (Explantes) grupo control.....	52
Gráf.25 Expresión de <i>NIS</i> (Explantes) grupo de cafetería.....	52
Gráf.26 Expresión de <i>PDE8B</i> (Explantes) grupo control.....	53
Gráf.27 Expresión de <i>PDE8B</i> (Explantes) grupo de cafetería.....	53
Gráf.I Consumo energético total.....	65
Gráf.II Carbohidratos.....	65
Gráf.III Lípidos.....	66
Gráf.IV Proteínas.....	66
Gráf.V Expresión de <i>TSHR</i> (Explantes) grupo control con respecto al tiempo.....	67
Gráf.VI Expresión de <i>TSHR</i> (Explantes) grupo de cafetería con respecto al tiempo.....	67
Gráf.VII Expresión de <i>NIS</i> (Explantes) grupo control con respecto al tiempo.....	68
Gráf.VIII Expresión de <i>NIS</i> (Explantes) grupo de cafetería con respecto al tiempo.....	68
Gráf.XI Expresión de <i>PDE8B</i> (Explantes) grupo control con respecto al tiempo.....	68
Gráf.X Expresión de <i>PDE8B</i> (Explantes) grupo de cafetería con respecto al tiempo.....	68

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO	ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ALT	Alanino aminotransferasa	mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato	Mui	Miliunidades internacionales
cAMP	Adenosín 3',5'-monofosfato cíclico	NIS	Simportador de sodio y yodo
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	NSH	Hipotiroidismo subclínico no autoinmune
cGMP	Guanosín 3',5'-monofosfato cíclico	OMS	Organización mundial de la Salud
Ct	Ciclo umbral (Threshold point)	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
D1, D2, D3	Desyodinasas 1,2 y 3	PDE8B	Difosfoesterasa 8B
DCAF	Dieta de cafetería	PKA	Proteína cinasa A
DEPC	Dietilpirocarbonato	QC	Control de calidad
DID	Diyodotirosina	RE	Reticulo endoplásmico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	rT3	Triyodotironina reversa
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	SNP's	Polimorfismos de un solo nucleótido
H₂O₂	Peróxido de hidrogeno	T3	Triyodotironina
HCl	Ácido clorhídrico	T4	Tiroxina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	TBG	Globulina fijadora de tiroxina
HF	Dieta alta en grasa (High fat)	Tg	Tiroglobulina
HS	Hipotiroidismo subclínico	Tm	Temperatura de fusión (Melting temperature)
HT	Hormona tiroidea	TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbencidina
I.P.	Intraperitoneal	TNF	Factor de necrosis tumoral
IL	Interleucina	TPO	Tiroperoxidasa
IMC	Índice de masa corporal	TRH	Hormona liberadora de triotropina
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública	TSH	Hormona estimulante de tiroides o Tirotropina
LDL	Lipoproteína de baja densidad	TSHR	Receptor de TSH
LT3	Triyodotironina libre	β-Act	β-Actina
LT4	Tiroxina libre	μl	Microlitros
MIT	Monoyodotirosina	μM	Micromolar

RESUMEN

La obesidad se ha relacionado con un aumento en los niveles séricos de tirotropina (TSH) sin producir cambios en la concentración de hormonas tiroideas. Por lo que en este trabajo nos enfocamos en estudiar si en un modelo de obesidad aumentan los niveles séricos de TSH, y si se presentan cambios en la expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas tiroideas como *TSHR*, *NIS*, y *PDE8B*.

Se trabajó con 14 ratas Sprague-Dawley de tres meses de edad, divididas en dos grupos de acuerdo con su dieta: dieta estándar (control) y dieta de cafetería (CAF) administrada durante 15 semanas. Se determinaron parámetros morfométricos semanalmente, los parámetros bioquímicos y la concentración sérica de TSH se determinó a las 15 semanas. Se realizó la extracción de RNA de tiroides y mediante RT-PCR en tiempo real, se evaluó la expresión del receptor de TSH (*TSHR*), simportador de sodio y yodo (*NIS*) y fosfodiesterasa 8B (*PDE8B*). Los datos fueron analizados en GraphPad Prism ® versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.).

A partir de la semana 5 se observó un aumento significativo del peso corporal del grupo de cafetería con respecto a los controles, el cual se mantuvo hasta la última semana. Dentro de los parámetros bioquímicos se encontró una disminución significativa en las concentraciones séricas de creatinina y ALT en el grupo CAF. En cuanto a la concentración de TSH sérica fue mayor en el grupo CAF, aunque no fue estadísticamente significativo (2.184 ng/mL vs. 2.25 ng/mL para el grupo control y CAF, respectivamente)

Al determinar la expresión de mRNA se observó que *NIS* presentaba una disminución estadísticamente significativa en el grupo CAF. Por el contrario, la expresión de *PDE8B* aumentó en el mismo grupo en comparación con el grupo control. Mientras que, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión para *TSHR*.

Estos resultados sugieren que la obesidad inducida por dieta de cafetería podría producir alteraciones en la síntesis de hormonas tiroideas debido a un aumento en *PDE8B* la cual está relacionada con la inactivación de cAMP, segundo mensajero generado por la estimulación de TSH que promueve la producción de HT. Además, al estar disminuida la expresión de *NIS*, el principal simportador de yodo a los tirocitos, se estaría afectando la síntesis de HT. Sin embargo, aún se necesitan más experimentos para demostrar esta hipótesis.

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad y el sobrepeso son un problema a nivel mundial y de acuerdo a la ENSANUT 2016 en México afectan al 34.4% de los adolescentes, y un 72.5% de los adultos. La obesidad se ha relacionado con DT2, hipertensión etc., y este trabajo se enfoca en su relación con el hipotiroidismo subclínico caracterizada por el aumento en los niveles séricos de TSH y los niveles normales de T3 y T4.

En pacientes obesos se ha encontrado una correlación positiva con la concentración de TSH, la cual se restablece con la disminución de peso, por lo que se ha asociado con el hipotiroidismo subclínico presente en el 40% de los pacientes con obesidad mórbida.

Los cambios en la dieta y la inactividad física son los principales factores que se han visto involucrados con la obesidad, principalmente por el consumo de alimentos hipercalóricos, por ello se ha decidido emplear el modelo de dieta de cafetería.

Este trabajo planteó la investigación sobre los efectos del modelo de obesidad (en ratas Sprague-Dawley) inducida por la dieta de cafetería (alimentos con alto contenido energético como galletas, donas etc.) en la modificación de los niveles séricos de TSH, además de identificar los cambios en la expresión del mRNA de genes clave de la síntesis de hormonas tiroideas como el receptor de tirotropina (*TSHR*), el simportador de sodio y yodo (*NIS*) y la fosfodiesterasa 8B (*PDE8B*).

Para lograr la identificación de los cambios de expresión se realizaron PCR en tiempo real, utilizando cDNA obtenido de tejido tiroideo, mientras que, para la

determinación de TSH se utilizó un kit de ELISA, además se evaluó la integridad del RNA obtenido y se analizaron las muestras sanguíneas para determinar sus parámetros bioquímicos.

Con los resultados obtenidos se podrán identificar los posibles mecanismos que se presentan a nivel de expresión génica en la tiroides por efecto de la obesidad, en la cual a pesar aumentar los niveles de TSH, no aumenta la producción de hormonas tiroideas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 OBESIDAD Y ENFERMEDAD TIROIDEA

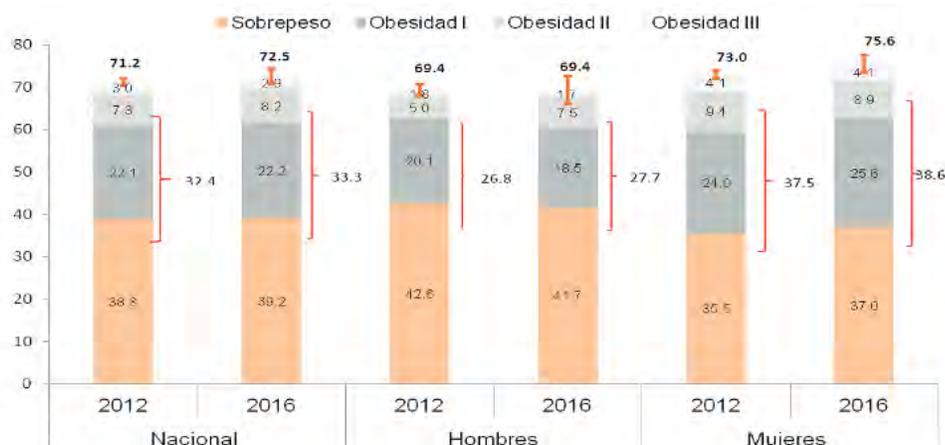
De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud, siendo la causa fundamental el desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas ¹.

En México, la obesidad se ha convertido en un problema de salud pública debido a que el 34.4% de los adolescentes (12-19 años), tienen sobrepeso u obesidad ², lo que representa alrededor de 6 325 131 individuos, indicando que uno de cada cinco adolescentes tiene sobrepeso y uno de cada diez presenta obesidad (Fig. 1). Aunque la ENSANUT 2016 reporta una reducción de 1.2 puntos porcentuales en la prevalencia de obesidad, no se puede concluir una disminución en la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad debido a los intervalos de confianza tan amplios que se presentaron ³.



Fig. 1 Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población adolescente de 12 a 19 años de edad, en la ENSANUT 2012 y 2016 por sexo ³.

En el caso de adultos mayores de 20 años se observa una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 72.5%. Para el 2016 se presentó un aumento de 1.3% con respecto a la encuesta del 2012, aunque no fue estadísticamente significativa, sugiere que la población adulta tiene mayores posibilidades de sufrir enfermedades asociadas a la obesidad. También se muestra que en lugar de reducirse la obesidad al llegar a la edad adulta está afecta a un mayor número de individuos (Fig. 2) ³.



Fuente: ENSANUT 2012 y ENSANUT MC 2016.

* Clasificación de IMC descrita por la OMS: sobrepeso = 25.0-29.9 kg/m², obesidad grado I = 30.0-34.9 kg/m², obesidad grado II = 35.0-39.9 kg/m², obesidad grado III ≥ 40.0 kg/m²

Fig. 2 Prevalencia nacional de sobrepeso y obesidad en población de 20 años de edad, en la ENSANUT 2012 y 2016 por sexo ³.

Es conocido que la obesidad es una enfermedad multifactorial, dónde interactúa tanto la genética como el ambiente, actualmente se han producido en el mundo cambios en la alimentación como son: la ingesta de alimentos hipercalóricos altos en grasa y azúcares, al mismo tiempo de la reducción de la actividad física; lo cual ha contribuido a que la población mundial sufra de sobrepeso, además de las enfermedades asociadas o consecuentes de ésta como lo es la diabetes, enfermedades cardiovasculares, dislipidemias, entre otras ¹.

Aparte de los factores mencionados anteriormente, se ha propuesto que los cambios a nivel hormonal podrían asociarse con el desarrollo de obesidad, debido a que desde hace varios años se ha descrito una relación muy estrecha entre la disfunción tiroidea y modificaciones en peso corporal. La obesidad se ha visto relacionada con altos niveles séricos de la hormona estimulante de tiroides (TSH por sus siglas en inglés), pero sin modificar los niveles de las hormonas tiroideas observándose una alta prevalencia de hipotiroidismo subclínico ⁴. Por ejemplo, se ha observado una correlación directamente proporcional entre el aumento de TSH sérica y el incremento en el índice de masa corporal (IMC), por el contrario, la relación entre el IMC y tiroxina libre (T4L) es inversamente proporcional, aún en valores normales de T4L esta proporción se mantiene. Por otro lado, se ha observado aumento en la triyodotironina (T3) y triyodotironina libre (T3L). De acuerdo con estos antecedentes, se ha sugerido que anomalías en la función tiroidea pueden tener efectos sobre la ganancia de peso, ya que al normalizarse los niveles, se observa disminución en la ganancia de peso corporal en pacientes con hipotiroidismo ⁵⁻⁷. En el hipotiroidismo subclínico, el cual se caracteriza por la elevación en el nivel basal de TSH sin observarse cambios en los niveles de T3 y T4L, se ha relacionado con alteraciones en el gasto energético teniendo como consecuencia la ganancia de peso. Sin embargo, al someterse a tratamiento farmacológico con L-tiroxina, estos pacientes pierden peso y se normalizan sus niveles de TSH ⁸.

2.2 GLÁNDULA TIROIDES

La glándula tiroides es una de las glándulas endocrinas más grandes, consta de dos lóbulos adheridos en la parte anterior de la tráquea por medio de tejido conjuntivo, ambos lóbulos se unen por medio de tejido tiroideo o istmo, confiriéndole una apariencia de mariposa. Cada lóbulo recibe suministro de sangre arterial de una arteria tiroidea superior y otra inferior; las cuales emergen de la arteria carótida externa y subclavia respectivamente. La sangre sale de los lóbulos por una serie de venas tiroideas que vacían en las venas yugular externa y braquiocefálicas, teniendo así un flujo mayor que el del riñón (Fig. 3 A y B) ^{9,10}. Asimismo, recibe innervación adrenérgica de los ganglios cervicales e innervación colinérgica del nervio vago, la cual regula la función vasomotora para aumentar la entrega de tirotropina (TSH), yoduro y sustratos metabólicos ¹¹.

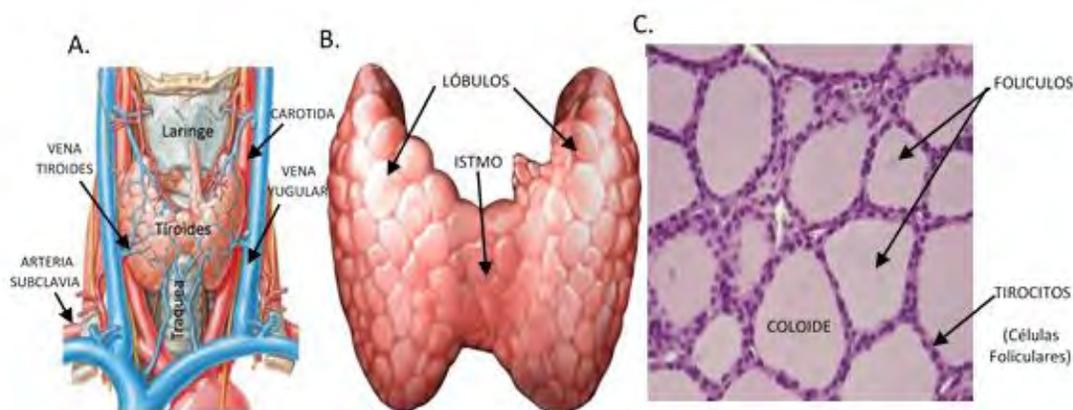


Fig. 3 A. Posición e Irrigación glándula tiroides. B. Esquema glándula tiroides. C. Micrografía (250X) de la glándula tiroides, cada folículo consiste de varios tirocitos que rodean al coloide ^{9,10}.

Los lóbulos tiroideos están formados por conjuntos de folículos esféricos (unidad funcional), recubiertos por una monocapa de células epiteliales cuboides llamadas

tirocitos, éstos se encuentran recubiertos por microvellosidades en la parte orientada hacia la luz. En la luz del folículo se encuentra una sustancia espesa, proteica y gelatinosa denominada coloide, en el cual se encuentra la tiroglobulina (Tg) 10-25%, proteína que constituye una forma de almacenamiento de las hormonas tiroideas ¹¹ (Fig. 3 C).

2.2.1 HORMONAS TIROIDEAS

La glándula tiroides tiene como principal función la biosíntesis de hormonas tiroideas las cuales se encargan de regular el metabolismo y la termogénesis. Además de estar involucradas en el gasto energético en reposo, participan también en el metabolismo de la glucosa y oxidación de lípidos ^{4,12}.

Al estar involucradas en el gasto energético en reposo, la disfunción tiroidea puede generar problemas en el control del peso corporal, como es el caso del hipotiroidismo donde existe un índice metabólico basal anormalmente bajo y se observa un aumento de peso y letargo. Por el contrario, en el hipertiroidismo se observa una pérdida de peso al aumentarse en índice metabólico basal.

Mientras que el hipotiroidismo clínico se caracteriza por el aumento de TSH y la disminución en la concentración de las hormonas tiroideas, en el hipotiroidismo subclínico únicamente se aumenta el nivel sérico de TSH, sin observarse cambios en los niveles de T3 y T4 ¹³.

La producción de T3 y T4 se da en una proporción de 80% y 20%, respectivamente, dentro de la glándula tiroides (Fig. 4). La tiroxina es una prohormona que requiere ser desyodada para ejercer su acción biológica en forma de T3 ¹⁴.

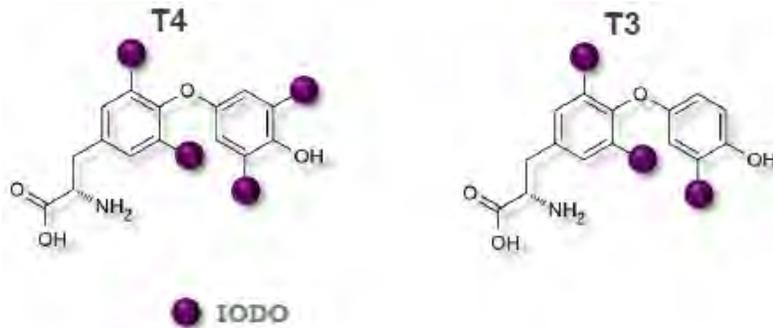


Fig. 4 Estructura de las hormonas tiroideas.

2.2.2 BIOSÍNTESIS HORMONAS TIROIDEAS

La biosíntesis de las hormonas tiroideas está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroides. En el hipotálamo, se genera la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) la cual ejerce su acción en la hipófisis para liberar a la tirotrópina, también conocida como hormona estimulante de tiroides (TSH), que va a activar a su receptor (TSHR) en la tiroides para promover la síntesis de T3 y T4. Éste proceso está regulado mediante una retroalimentación, debido a que al disminuir los niveles de T3 y T4 en plasma, se estimula la secreción de TRH y por consiguiente de TSH. Mientras que, cuando aumentan los niveles plasmáticos de T3 y T4 disminuye la liberación de TSH ¹⁵. Como se mencionó anteriormente, el receptor de tirotrópina (TSHR) participa de manera importante en la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas en la célula folicular. El TSHR es un receptor que consta de siete regiones transmembranales, acoplado a proteína G ¹⁶. La proteína G se activa al separarse

la subunidad α de $\beta\gamma$ y sus efectos son mediados por $G\alpha_s$ y $G\alpha_{q11}$ ¹⁷. La proteína $G\alpha_s$, es el intermediario que se encarga de la señalización entre el receptor y la adenilato ciclasa (ambas se encuentra en el lado basolateral del tirocito), la cual al activarse produce un segundo mensajero el adenosín 3',5'-monofosfato cíclico cAMP ^{15,18}, que activa a la proteína cinasa A (PKA), entre otras moléculas, regulando la transcripción de genes centrales en la síntesis de hormonas tiroideas (Fig. 5) ^{15,17,18}.

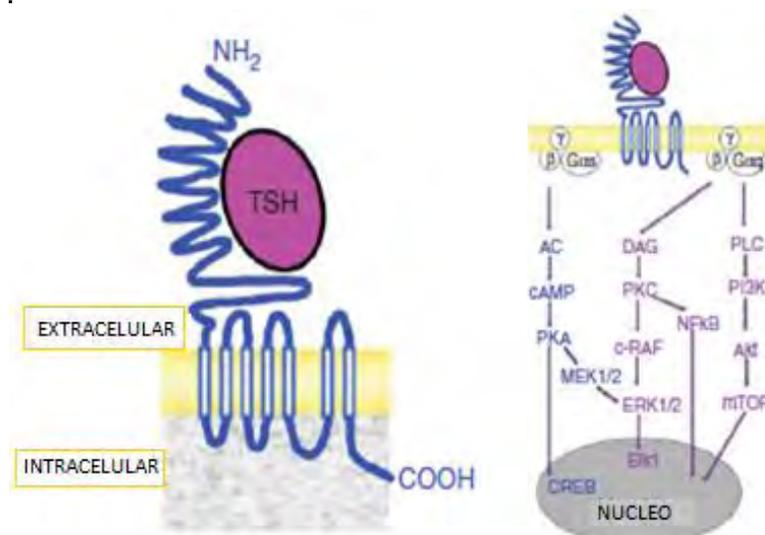


Fig. 5 Receptor de la hormona estimulante de tiroides (TSHR) ¹⁷.

La biosíntesis de hormonas tiroideas se lleva a cabo en la membrana apical de la célula tiroidea; para entender mejor este proceso, se explicará en seis fases incluyendo su secreción (Fig. 6) ¹⁹.

a) FORMACIÓN DE LA TIROGLOBULINA (Tg)

La tiroglobulina es una glicoproteína estructural la cual se forma a partir de una proteína precursora compuesta por dos unidades que se mantienen unidas por puentes disulfuro. Estas subunidades son sintetizadas en el retículo endoplásmico

(RE) rugoso, las cuales pasan al RE liso donde se da la dimerización y glicosilación. En el aparato de Golgi, se encierran las glicoproteínas en vesículas las cuales viajan a la membrana apical y se funden con ella. Posteriormente, se obliga a la proteína precursora de Tg a salir a la superficie de la célula para continuar con la yodación¹¹.

b) CAPTACIÓN Y LIBERACIÓN DE YODURO

Antes de realizar la yodación se requiere captar al yoduro, lo cual se lleva a cabo por medio del simportador (cotransportador unidireccional) de sodio y yodo (NIS), el cual se encuentra en la membrana plasmática basal de la célula folicular⁸. NIS utiliza el gradiente de sodio a través de la membrana basal para transportar un átomo de yoduro junto con dos iones de sodio hacia el interior del citosol de la célula folicular. Se necesita la Na⁺K⁺ATPasa para bombear sodio fuera de la célula y así mantener el gradiente de sodio, también puede captar otros iones como bromuro, tiocianato y perclorato, que funcionan para reducir la captación de yoduro. Debido a esta captación, la concentración de yoduro es mucho mayor en los tirocitos que en circulación. Una vez dentro de la célula, la pendrina se encarga de transportar el yoduro hacia el folículo para yodar a Tg¹¹.

c) OXIDACIÓN Y ORGANIFICACIÓN

La enzima tiroperoxidasa (TPO), se encuentra en la membrana apical de los tirocitos, cataliza la yodación de algunos residuos de tirosina en la proteína precursora de Tg. Esta enzima microsomal requiere de una fuente de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el cual se genera en el interior del tirocito por la acción del sistema

generador DUOX. La TPO oxida al ión yoduro y al residuo de tirosina formando radicales libres de vida corta. Como resultado se tiene un residuo de monoyodotirosina (MIT), que se une a la tiroglobulina mediante un enlace peptídico²⁰. De la misma forma se pueden seguir añadiendo otro átomo de yodo formando un residuo de diyodotirosina (DIT)^{8,11}.

d) ACOPLAMIENTO

Los residuos generados que aún se encuentran unidos a la molécula precursora de tiroglobulina, pasan por una reacción de acoplamiento formándose así la yodotironina. Se cree que la TPO cataliza esta reacción por medio de la oxidación de residuos cercanos de tirosina yodada a radicales libres de vida corta. Estos radicales libres experimentan otros procesos de adición para producir un residuo de yodotironina y un residuo de deshidroalanina. Si se acoplan dos residuos DIT se forma T4 y en menor proporción (20-25 %) se une un residuo de MIT con un DIT para generar la T3¹¹.

e) SECRECIÓN

Para que se lleve a cabo la liberación de hormonas tiroideas, es necesario la fagocitosis de la tiroglobulina por parte de los tirocitos. Durante la pinocitosis las vesículas que se generan migran hacia la región basal donde los lisosomas se funden a las gotas que contienen la tiroglobulina y la hidrolizan hasta sus componentes aminoácidos. De esta forma se liberan la T3, T4 y los otros aminoácidos yodados en el interior del citosol¹¹.

Las hormonas tiroideas se liberan a la circulación capilar más cercana, y se unen inmediatamente a proteínas plasmáticas como la globulina fijadora de tiroxina (TBG). Mientras que, en el interior del tirocito la MIT y DIT se desyodan rápidamente para así volver a utilizar el yoduro liberado para yodar a la tiroglobulina ¹¹.

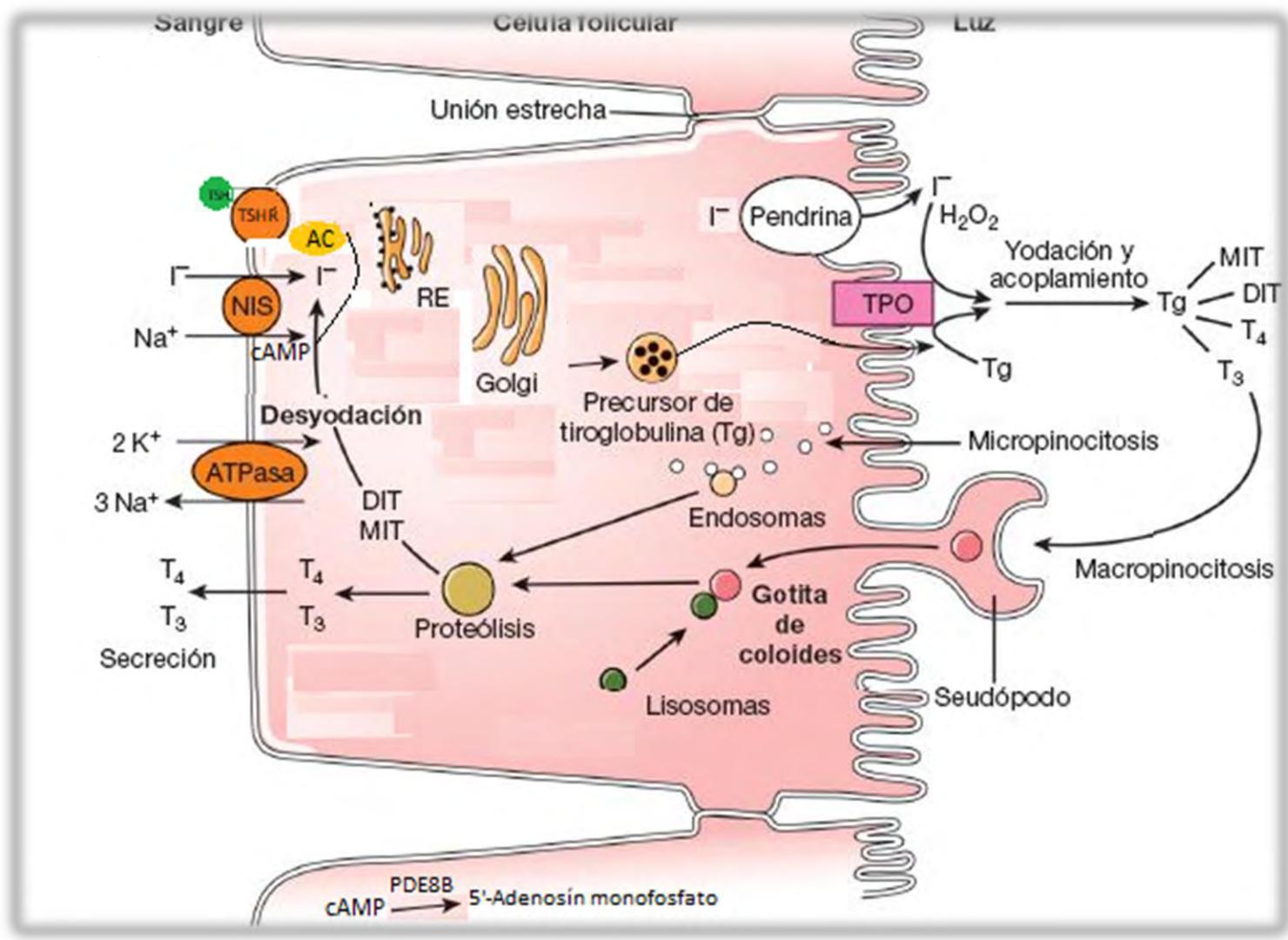


Fig. 6 Síntesis de las hormonas tiroideas ^{11,20}.

f) DESYODACIÓN

La producción de T3 ocurre principalmente fuera de la tiroides como consecuencia de la desyodación de T4 en tejidos periféricos, es así como los cambios en la expresión de las desyodinasas participan en la homeostasis de T3. La desyodinasa tipo 2 (D2) cataliza la conversión de T4 en T3 al quitar el átomo de yodo del anillo fenólico y así incrementa sus niveles intracelulares. Por otra parte, la desyodinasa 3 (D3) se utiliza como mecanismo de regulación de la concentración de T3 al eliminar el yodo de la posición 5- pero del anillo tirosilo interno, generando un metabolito biológicamente inactivo, la T3 inversa (rT3). Otra forma de inactivar la T3 libre (T3L) es con la desyodinasa 1 (D1) la cual elimina el mismo yodo que la D3 para formar T2 (Fig. 6) ^{14,21}.

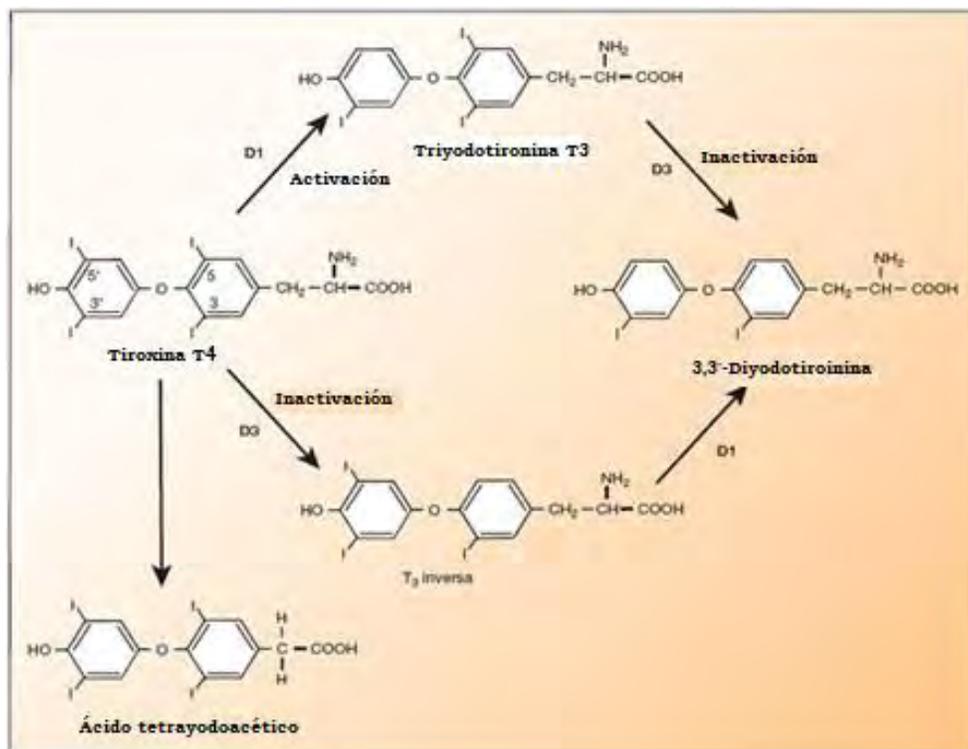


Fig. 7 Desyodación de las hormonas tiroideas ¹¹.

Un aumento en la formación de T3 intracelular causa el efecto conocido como tiroxicosis, mientras que, D3 cataliza la conversión de T3 a T2, generando un hipotiroidismo intracelular. Además, cada tejido puede tener un estado de tiroxicosis o hipotiroidismo independiente de la concentración sérica, y esto se debe a la actividad de las desyodinasas y de su capacidad de transformar las hormonas tiroideas ¹⁴.

2.2.1 FOSFODIESTERASA (PDE)

Las fosfodiesterasas (PDE), son enzimas tipo hidrolasa que actúan sobre nucleótidos cíclicos generando su correspondiente 5'-nucleosido fosfato, algunos de sus principales sustratos son cAMP y cGMP, esto dependiendo de su especificidad (Fig. 8) ²². Se ha observado que la concentración basal de cAMP es de 1 μ M, aunque para activar PKA se requieren concentraciones diez veces mayores. Si se mantuviera la concentración elevada de cAMP, se alcanzaría un equilibrio en el cual se perdería su actividad, así que la PDE actúa para disminuir la concentración de cAMP. La activación de algunas isoformas de PDE se ha visto que es mediante PKA al fosforilar cierto residuo de serina ²³. La familia de las PDE está implicada en la patogénesis en un gran número de enfermedades, incluyendo enfermedades cardiovasculares, problemas renales, hiperplasia, y algunas variantes en patogénesis inflamatoria ²⁰. La fosfodiesterasa 8B, es una isoforma que se encuentra en la glándula tiroides, por su acción es específica sobre cAMP y se ha descrito que afecta la señalización de TSH y la producción de hormonas tiroideas ^{24,25}.

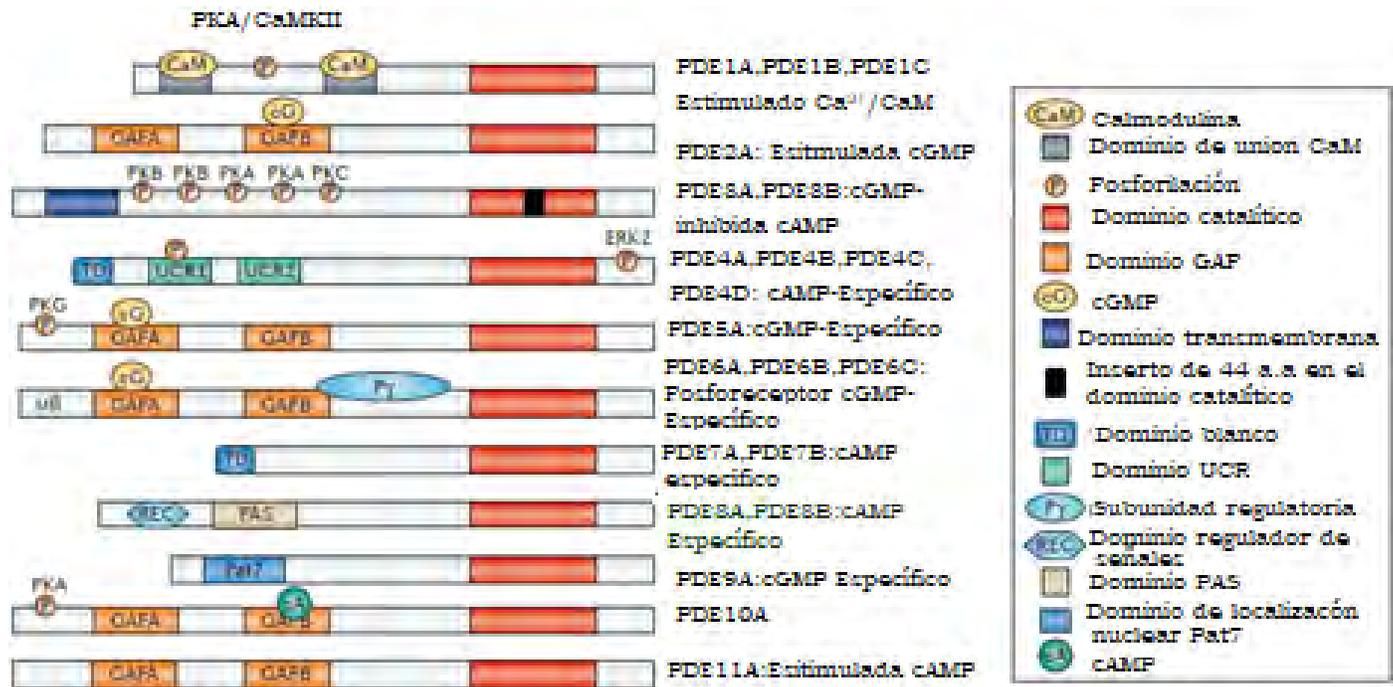


Fig. 8 Familia de fosfodiesterasas (PDE's) ²².

2.3 ENFERMEDADES TIROIDEAS

Para el diagnóstico de las enfermedades tiroideas The American Thyroid Association's Guidelines sugiere que se realice un tamizaje de TSH para todos los pacientes a partir de los 35 años y se verifique cada 5 años. Y en el caso de tener familiares con antecedentes de enfermedades tiroideas se lo pueden hacer en periodos de tiempo más cortos ^{22,26-29}.

Los factores de riesgo incluyen anemia perniciosa, diabetes mellitus, radiación previa en la región de cabeza y cuello, vitiligo, historial familiar de enfermedad tiroidea, enfermedades autoinmunes; y consumo de medicamentos con yodo (ejemplo: medio de contraste) ²⁶.

La primera fase del tamizaje es la examinación de parte de la cabeza y cuello utilizando la palpación del cuello. Si se encuentran anomalías anatómicas de la

tiroides se prosiguen con los estudios de laboratorio, para confirmar hipo- o hipertiroidismo, la determinación de TSH es la mejor prueba debido a que representa la retroalimentación de las hormonas tiroideas con el hipotálamo ^{26,30,31}.

Los niveles normales de TSH son 0.45-4.5 mUI/L y los niveles normales de T4L son 0.7 – 1.24 ng/dL, a partir de los cuales se hace la clasificación de las enfermedades tiroideas.

Las principales enfermedades tiroideas son (Tabla 1):

- Hipotiroidismo: Refleja una glándula tiroides hipo-activa. El hipotiroidismo significa que esta no es capaz de producir suficiente hormona tiroidea para mantener el cuerpo funcionando de manera normal. Los niveles sanguíneos de hormonas tiroideas en estos pacientes es baja. Algunas de las causas frecuentes son la Tiroiditis de Hashimoto enfermedad autoinmune, en la que se sugiere la eliminación quirúrgica de tiroides y el tratamiento farmacológico ³².

- Hipotiroidismo primario

Clínico: Definido como concentraciones de TSH elevadas (mayor de 10 mUI/L) con niveles séricos de T4L baja.

Subclínico: Definido por elevación de TSH fuera del rango de normalidad (mayor de 4.5 mUI/L) con niveles séricos de T4L normal.

Leve: Cuando se presentan niveles de TSH mayores a 4.5 pero menores de 10 mUI/L.

Severo: Presenta niveles de TSH mayores de 10 mUI/L ^{27,33}.

- Hipotiroidismo secundario
Se caracteriza por una concentración de TSH inapropiadamente normal o baja, con niveles bajos de T4L.
- Hipertiroidismo: Se refiere a cualquier condición en la cual existe demasiada hormona tiroidea en el organismo. En otras palabras, la glándula tiroides está hiper-activa ³⁴.
 - Hipertiroidismo subclínico: Hormonas tiroideas normales y TSH >0.1- <0.45 mUI/mL.
 - Hipertiroidismo clínico: TSH <0.01 mUI/mL y T4L elevada (primario) y TSH normal o aumentada con T4L normal (secundario) ³.
 - Enfermedad de Graves o hipertiroidismo autoinmune está caracterizado por el aumento en los niveles de las hormonas tiroideas, y la presencia de anticuerpos para Tg, TPO y TSHR ^{27,35}.

Tabla 1 Test de tamizaje de la función tiroidea ^{26,29}.

Presunto diagnóstico	NIVEL DE TSH	TIROXINA LIBRE T4L
Hipertiroidismo primario	-	+
Hipertiroidismo secundario	+/N	+
Hipotiroidismo primario	+	-
Hipotiroidismo secundario	-/N	-
Hipotiroidismo subclínico	+	N
Hipertiroidismo subclínico	-	N
Estado eutiroideo	N	N

- - = Disminución niveles séricos
- + = Aumento niveles séricos
- N = Niveles séricos normales

2.4 RELACIÓN ENTRE TSH, HORMONAS TIROIDEAS Y LA OBESIDAD

La obesidad es caracterizada por un desequilibrio crónico de calorías consumidas contra las gastadas, lo cual genera un aumento en el almacenamiento de energía en forma de depósitos intracelulares de triglicéridos en el adipocito. Éste almacenamiento se manifiesta por la acumulación de lípidos intracelulares y el tamaño del adipocito (hipertrofia) y por el número de adipocitos (hiperplasia) ³⁶. El receptor para TSH se encuentra en los adipocitos y se ha observado que su estimulación promueve la adipogénesis, favoreciendo la maduración de preadipocitos a adipocitos ¹⁶. Mientras que en un modelo de obesidad con dieta alta en grasa (HF "high-fat") en ratas Sprague-Dawley, se identificó, que este tipo de dieta induce disfunción tiroidea aumentando los niveles de TSH y disminuyendo los niveles de T4L, así como cambios morfológicos anormales en la tiroides. Igualmente, se observó que en estos animales obesos aumentan los niveles de triglicéridos ³⁷.

Por otra parte, en estudios clínicos llevados a cabo en niños obesos, se ha observado que hay una elevación en TSH y disminución en T3L, pero no hay cambios en T4L. Estas alteraciones se contrarrestan al bajar de peso, aunque no son significativos si la disminución de peso no es sustancial por ejemplo de un IMC basal de 2.4 a 1.7 ³⁸. En otro estudio, se analizaron pacientes con obesidad mórbida y se identificó que los sujetos obesos presentaban altos niveles de TSH sérica de manera similar a los pacientes con hipotiroidismo subclínico (HS), aunque no se encontró relación entre los niveles de T4L y su IMC, si se observó que en 8% de los

pacientes disminuyeron T4L y T3L y aumentaron la TSH sérica en comparación con los controles sin HS ³⁹.

De acuerdo a los antecedentes mostrados por varios estudios, los niveles de TSH se encuentran aumentados en la obesidad, sin embargo, los mecanismos responsables no son del todo claros. Al respecto, se han propuesto algunas teorías que tratan de explicar la alteración a los niveles de TSH por efecto de la obesidad (Fig. 9):

- a) Es bien conocido que en la obesidad se observa incremento en los niveles plasmáticos de leptina (hiperleptinemia), la cual estimula la transcripción de pro-TRH y como consecuencia la producción de TRH y TSH. Además, estimula la actividad de desyodinasas provocando un desequilibrio en las hormonas tiroideas.
- b) Se cree que el incremento en la conversión de T4 a T3 por la actividad de las desyodinasas es para controlar la acumulación de grasa al aumentar el gasto energético.
- c) Se considera que la obesidad se caracteriza por la presencia de un proceso inflamatorio de bajo grado donde hay una producción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1, IL-6 las cuales inhiben la expresión de mRNA de *NIS* y a su vez la capacidad de capturar yodo.
- d) Resistencia a la insulina es un desorden característico de la obesidad, se ha encontrado una asociación positiva entre los niveles séricos de TSH y la resistencia a la insulina.

e) El aumento de TSH y T3 para contrarrestar la disminución en la respuesta de los tejidos a las hormonas tiroideas (Resistencia a las HT) se considera como mecanismo compensatorio ^{4,40,41}.

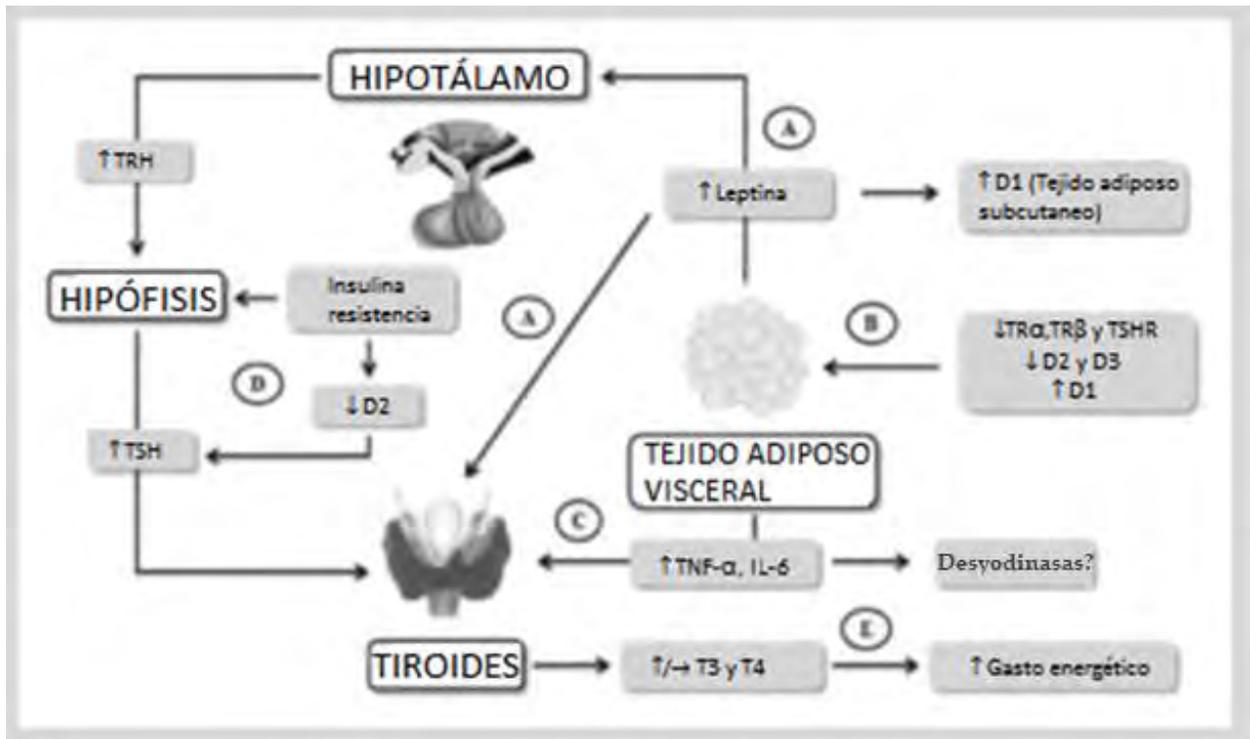


Fig. 9 Teorías sobre el aumento de TSH en la obesidad ⁴¹.

2.5 DIETA DE CAFETERÍA

El incremento de la obesidad está relacionado por cambios en los hábitos alimenticios, con mayor ingesta de alimentos hipercalóricos, debido a que se incluye comida rápida, snacks, etc. El modelo dieta de cafetería (CAF), consiste en la inducción de obesidad mediante una dieta energéticamente elevada, la cual incluye alimentos altos en grasa, energía y azúcar, tales como chocolates, galletas, panes, crema de cacahuete; entre otros. A los animales también se les proporcionan peletes de comida balanceada y así pueden elegir el alimento a consumir. En estudios previos, se ha observado que la dieta de cafetería es un buen modelo para inducir obesidad, debido a que produce hiperfagia (desregulación del apetito) y obesidad al provocar una desregulación en el tejido adiposo. Se ha propuesto como un modelo importante en la generación de síndrome metabólico debido a cambios en el hígado como hepatoesteatosis e inflamación. Las cepas de ratas comúnmente utilizadas en este tipo de dieta son las ratas Sprague-Dawley y Wistar ⁴²⁻⁴⁴.

2.6 CAMBIOS DE TSH-R, NIS Y PDE8B EN LA OBESIDAD.

Al identificarse que los pacientes obesos presentan elevación en los niveles de TSH, se han realizado evaluaciones *in vitro* de cómo estas concentraciones de TSH alteran los niveles de expresión de algunos genes en la tiroides. Se ha identificado que existe relación entre los niveles de TSH y la expresión de *NIS*, el cual codifica para el simportador transmembranal que se encarga de la captura de yodo. En cultivos celulares de tirocitos, se ha observado que la TSH incrementa la expresión de mRNA de *NIS* ⁴⁵, y este aumento también se refleja en sus niveles de proteína

³⁷. En estudios *in vitro*, se demostró que esta regulación era a través de la liberación de cAMP ^{46,47}. Además de tener efecto a nivel transcripcional sobre NIS, se encontró que TSH también tenía efectos a nivel postranscripcional. Esto se observó al estudiar vesículas de membrana preparadas en células FRTL-5, las cuales perdían la capacidad de captar el yodo tras privarlas de TSH. Sin embargo, al estimularlas nuevamente con TSH podían captar yodo nuevamente, lo que sugirió que la proteína de NIS estaba presente en las vesículas. Además, se demostró que la fosforilación y la vida media de NIS son mediadas por la presencia de TSH ⁴⁷.

Aunque existen en la literatura varios trabajos donde describen que la obesidad produce cambios en la expresión del TSHR en tejidos extratiroideos, por ejemplo el adiposo. Hasta la fecha no se han reportado estudios que demuestren que los cambios en la producción de hormonas tiroideas se deben a alteraciones en la expresión de *TSHR* en la tiroides de pacientes con obesidad o hipotiroidismo subclínico. La información reportada es únicamente sobre polimorfismos que pueden alterar la funcionalidad del receptor, teniendo como consecuencia un hipotiroidismo subclínico ⁴⁸.

Por otra parte, se ha descrito que los SNPs en el gen *PDE8B* (rs6885099, rs2046045 y rs4704397), se asocian con variaciones en los niveles de TSH. Por ejemplo, el polimorfismo rs4704397 se ha visto asociado con hipotiroidismo subclínico en el embarazo y con niveles elevados de TSH en niños obesos. Por lo que se ha propuesto que *PDE8B* podría generar la reducción de cAMP en la

glándula tiroides, disminuyendo así la respuesta estimulante de TSH y, por lo tanto, los niveles de las hormonas tiroideas ⁴⁹.

Los datos anteriores muestran cierta similitud a lo que se ha descrito en modelos de hipotiroidismo en animales ⁴⁶. De igual manera, estudios realizados en un modelo de obesidad con dieta alta en grasa, encontraron que este tipo de dieta provoca un aumento en los niveles de TSH y las hormonas tiroideas (T4, T3, T4L y T3L), además de cambios en la expresión de moléculas involucradas en la biosíntesis de estas hormonas ³⁷.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La obesidad es una de las principales enfermedades que afecta a la población mexicana; caracterizándose por generar un desequilibrio a nivel metabólico. Se ha relacionado con alteraciones morfológicas y funcionales en la tiroides ⁶. De acuerdo con datos reportados por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) el hipotiroidismo subclínico (HS) puede afectar aproximadamente al 10% de la población mexicana ⁵⁹. Sin embargo, en obesidad se ha observado un aumento de esta prevalencia, alcanzando valores de hasta 48.5% en pacientes con obesidad extrema ⁵¹.

Como se mencionó, el HS se caracteriza por el incremento de la concentración sérica de TSH sin modificación de la concentración de las hormonas tiroideas (T3 y T4). Se ha descrito que las hormonas tiroideas regulan negativamente la producción de TSH en la hipófisis. Por lo tanto, al no producirse en concentraciones adecuadas contribuyen a mantener altos los niveles séricos de TSH. Sin embargo aún no se ha descrito como es que a pesar del aumento de TSH en la obesidad, los niveles de las hormonas tiroideas no se alteran, generando así un hipotiroidismo subclínico en los pacientes con obesidad.

Razón por la cual este trabajo se enfocó en investigar si el modelo de obesidad por dieta de cafetería en animales podría alterar los niveles séricos de TSH, y si la obesidad produce modificaciones en la expresión de genes relacionados con la síntesis de hormonas tiroideas como *TSHR*, *NIS*, y *PDE8B*.

4. HIPÓTESIS

La obesidad inducida a ratas Sprague-Dawley por dieta de cafetería aumentará los niveles de TSH y modificará la expresión de *NIS*, *TSHR* y *PDE8B*, genes relacionados con la síntesis de hormonas tiroideas en la glándula tiroides.

5. OBJETIVOS

- *OBJETIVO GENERAL*

Evaluar el efecto de la obesidad inducida por dieta de cafetería sobre los niveles séricos de TSH, así como en la expresión de los genes *TSHR*, *NIS* y *PDE8* en la glándula tiroides de ratas Sprague-Dawley.

- *OBJETIVOS PARTICULARES*

- ✓ Evaluar semanalmente el cambio en el peso corporal de las ratas Sprague-Dawley del grupo control y dieta de cafetería.
- ✓ Analizar el perfil bioquímico (glucosa, colesterol, triglicéridos) en ambos grupos para identificar alteraciones en el grupo de dieta de cafetería.
- ✓ Determinar el cambio en los niveles séricos de TSH producidos por la dieta de cafetería por medio de la técnica de ELISA.
- ✓ Evaluar los cambios en la expresión de los genes *TSHR*, *NIS* y *PDE8* en la glándula tiroides de ratas Sprague-Dawley utilizando RT-PCR.
- ✓ Realizar pruebas preliminares para determinar si la incubación *in vitro* de tiroides con TSH produce cambios en la expresión de *TSHR*, *NIS* y *PDE8B*.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 TIPO DE ESTUDIO

Experimental.

6.2 LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO

El Proyecto se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica que se encuentra en el Hospital de Especialidades Bernardo Sepúlveda, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

6.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN

Tabla 2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para los animales utilizados.

INCLUSIÓN	EXCLUSIÓN	ELIMINACIÓN
Ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad	Enfermedades gastrointestinales	Enfermedades gastrointestinales y respiratorias
Aumento de peso constante como el resto del grupo	Enfermedades respiratorias	Pérdida de cabello, anomalías en tejidos, por ejemplo nódulos.

6.4 MATERIAL Y MÉTODOS

6.4.1 Sujetos de estudio

Se trabajó con 14 ratas Sprague-Dawley de tres meses de edad proporcionadas por el bioterio de CMN siglo XXI, las cuales se dividieron en dos grupos: control (n=7) y dieta de cafetería (n=7). Los animales se mantuvieron en una habitación con ciclos de 12/12 horas luz/oscuridad, y condiciones de temperatura y humedad controladas. Para sus camas se utilizó viruta estéril y se mantuvieron en cajas de acrílico con tapas de acero.

6.4.2 Dieta

Grupo control: Tuvo libre acceso a agua y alimento estándar Formulab Diet 5008. Se midió la ingesta de alimento diariamente para calcular el consumo energético de acuerdo a los datos del fabricante (LabDiet).

Grupo cafetería (CAF): Tuvo libre acceso a agua, alimento estándar Formulab Diet 5008 (LabDiet) y a alimentos hipercalóricos de marcas comerciales como: galletas saladas y dulces, donas, frituras, cereales, chicharrón de cerdo entre otros. Durante las dos primeras semanas se identificaron los alimentos de su preferencia para posteriormente continuar con la dieta durante 15 semanas. Se midió el consumo diario de alimento y de agua para obtener el consumo energético.

Los animales de los dos grupos se pesaron semanalmente para determinar la ganancia de peso corporal. Se midió la circunferencia abdominal y la longitud hocico-año para calcular el índice de masa corporal (IMC) de acuerdo a lo reportado por Novelli y cols.⁵².

6.4.3 Disección

Al término de las 15 semanas de dieta, las ratas se sacrificaron anestesiándolas con pentobarbital sódico (30-50 mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal (I.P.). Se recolectó la sangre total mediante punción cardiaca, en un tubo morado que contenía EDTA como anticoagulante y uno rojo sin anticoagulante para la obtención de plasma y suero, respectivamente. Posteriormente se disectó la tiroides, realizando un corte longitudinal en el cuello, se limpió retirando el tejido graso y conjuntivo, asimismo de las glándulas paratiroides. Se colocó en una solución salina

amortiguadora de fosfatos (PBS) en frío, donde se midió y se cortó en fragmentos que fueron guardados en Tripure® para la extracción de RNA y en medio de cultivo (DMEM) para las pruebas preliminares de incubación con TSH.

Asimismo, se midió el tamaño de las glándulas tiroideas en ambos grupos.

6.4.4 ELISA

Se realizó la cuantificación sérica de TSH, por medio del kit de ELISA para murinos (ABNOVA). Para lo cual se utilizó el suero obtenido por punción cardiaca. Este método se basa en el principio de un ensayo inmunoabsorbente en fase sólida con enzima conjugada, es una ELISA tipo sándwich directa.

- Preparación de reactivos

Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente antes de comenzar. Los estándares se encontraban liofilizados, así que se reconstituyeron con 1 mL de standard/simple diluent, una vez reconstituido se debe guardar a -20 °C si no se usa. Por otra parte, la solución amortiguadora de lavado se diluyó con agua destilada 1 parte con 19 partes de agua (es estable de 1 a 3 meses a 4-8 °C).

- Muestras

Se dividió la placa en tres partes, una para la curva estándar (100 µL por estándar: 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 ng/mL), otra para los controles de calidad (100 µL de cada uno QC1 1.5-2 ng/mL y QC2 4-5 ng/mL) y la última para las muestras (100 µL suero por muestra). Se agregaron 100 µL de la enzima conjugada a cada pozo y se agitó la

placa por 30 s, posteriormente, se incubó a 37 °C en baño María por 3 horas en una bolsa sellada.

- Lavados

Se removió la mezcla de incubación por decantación de la placa en un contenedor, se enjuagaron y decantaron los pozos cinco veces con la solución amortiguadora de lavado. Se agitó la placa rápidamente en un papel absorbente hasta remover todas las gotas.

- Color

Se agregaron 100 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) en cada pozo y agitó 10 s e incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de la solución stop (HCl 2N) en cada pozo, luego se agitó por 30 s, y se observó el cambio de color azul a amarillo.

- Lectura

Se leyó a una densidad óptica de 450 nm.

NOTA: El paso de lavado es crítico, si es insuficiente el resultado tiene poca precisión y lecturas elevadas, las cuales pueden resultar falsas.

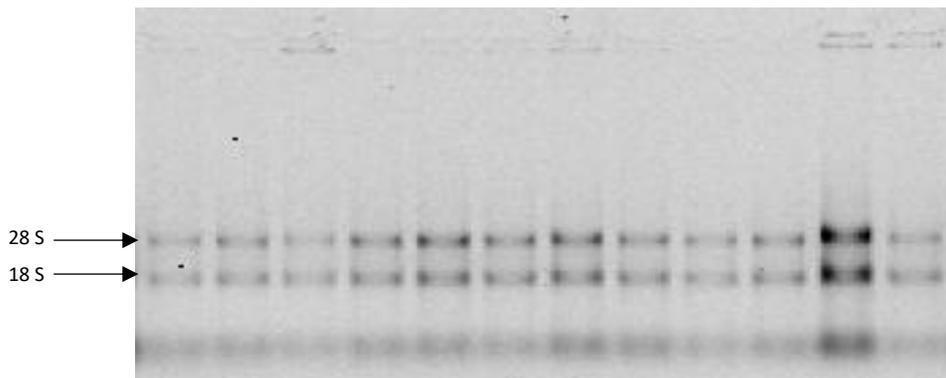
6.4.5 Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó homogenizando 500 mg de tiroides en 1 mL de Tripure® a 4 °C. Después se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó 15 s y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Se centrifugó a 1400 rpm durante

15 min a 4 °C, se extrajo la fase acuosa y se adicionaron 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA y se centrifugó a 1400 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 1mL de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) en 2 ocasiones, centrifugando durante 10 min a 12000 rpm para compactar el RNA, se decantó el etanol y se dejó secar durante 10-20 min para eliminar el exceso de etanol. El RNA se disolvió en 30 µL de RNA storage solution (buffer de citrato de sodio 1M, Ambion).

6.4.6 Electroforesis

Para evaluar la integridad del RNA obtenido se realizó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, agente intercalante el cual se excita con luz UV para emitir fluorescencia. En el transiluminador Gel Doc 2000 Bio Rad se observaron las bandas pertenecientes a la subunidad mayor y menor del RNA ribosomal 28s y 18s respectivamente.



Fotografía 1 Electroforesis de RNA.

6.4.7 Cuantificación

Para determinar la concentración y calidad del RNA se colocaron 2 μL de muestra en el espectrofotómetro Epoch, el cual realiza lecturas a diferentes longitudes de onda: 260 nm, 280 nm y 320 nm en los que determina la concentración de RNA, proteínas y contaminación con disolventes, respectivamente. Conjuntamente, se evaluó la relación 260/280 la cual se encontró entre 1.6-2 para así considerarla una muestra de buena calidad.

6.4.8 Tratamiento con DNasa

A 1 μg de RNA total se le adicionó 1 μL del amortiguador de reacción con MgCl_2 10x, 1 μL de DNasa I, RNasa-free (#EN0521) y agua libre de nucleasas suficiente para 10 μL de volumen total de reacción, este paso se realizó a 4 °C. Posteriormente se incubó a 37 °C por 30 min, al terminar la incubación se adicionó 1 μL de EDTA 50 mM, el cual es un agente quelante y detuvo la reacción. El RNA se encuentra listo para utilizarse en la reacción de transcriptasa reversa.

6.4.9 RT-PCR

6.4.9.1 cDNA

Después de obtener el RNA se realizó la reacción de transcriptasa reversa, dónde se utilizó 1 μg de RNA total, para la obtención del cDNA se utilizó el kit RevertAid RT (Promega).

Se hizo una mezcla de reacción con 1 μL de primers, 4 μL de Buffer de reacción 5x, 1 μL de RiboLock, 2 μL de dNTPs 10 mM, 1 μL de ReverAid RT, por 10 μL de la muestra obtenida del paso de DNasa. Después de agregar la mezcla de reacción

se colocó en el termociclador de punto final Axygen Maxygene, con las siguientes condiciones:

Tabla 3 Condiciones cDNA; Se utiliza la reacción de la transcriptasa reversa para obtener cDNA a partir de RNA.

Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4	Paso 5
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	4 °C
2 min	10 min	15 s	1 min	8

6.4.9.2 PCR Tiempo Real

Para determinar los niveles de expresión de *NIS*, *PDE8B* y *TSHR* se realizó una mezcla de reacción con 2.5 µL de Master Mix SYBR Green/Rox (2X), el cual contiene máxima SYBR Green qPCR amortiguador (KCl, (NH₄)₂SO₄), Taq DNA polimerasa, dNTP's, MgCl₂, etc., elementos requeridos para la amplificación, 0.5 µM de los cebadores a utilizar (*NIS*, *PDE8*, *TSHR* y *β-actina*)*, y 1 µL de agua.

La secuencia de los cebadores utilizados es:

Tabla 4 Secuencia de cebadores; se utilizó como gen de referencia (Housekeeping) a β-Act para evaluar la expresión de TSHR, NIS y PDE8B.

<u>PRIMERS*</u>	FORWARD	REVERSE
β-ACT	CCTGAGCGCAAGTACTCTGTGT	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
TSHR	GACCCACTTTGCTAGACGTG	GAGAGTCCAGGTGTTCTTCGC
NIS	GCCCTTG TAGATTCAGTAGGCA	GTGACAGCCCTCCGTTTCTC
PDE8B	TCAAGAA TATCGACAGGAACCAC	TCACATGTTCAAAGTGTTTTGTCA

Se colocó en la placa 1 μL de la muestra en el fondo de cada pozo (Se utilizaron placas de 384 pozos) y posteriormente se agregaron 4 μL de la mezcla de reacción antes preparada, dando un volumen total de 5 μL de reacción.

Las muestras se cargaron por duplicado, una vez listas las muestras se procesaron en el equipo 7900 HT fast Real-Time PCR System⁵³.

Las condiciones de amplificación fueron:

Tabla 5 Condiciones de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa); para cuantificar la expresión relativa de RNA se utilizó la PCR en tiempo real.

	30 ciclos			1 ciclo		
	Desnaturalización	Alineamiento	Elongación	Tm		
50 °C	95 °C	95 °C	60 °C	90 °C	60 °C	95 °C
2 min	10 min	15 s	1 min	15 s	15 s	15 s

Al final del programa de termociclado, se agregó una curva de disociación para determinar la temperatura de fusión (Tm “Melting temperature”), la cual permite identificar la especificidad de la PCR, mediante la presencia de un solo producto de amplificación.

6.4.10 Incubación de explantes de tiroides con TSH

Se realizaron pruebas preliminares incubando explantes de tiroides con TSH en medio DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium, Gibco), utilizando la incubadora Nuair modelo UN-425-400 con 95% de humedad, 5% de CO₂ a 37 °C. Se emplearon tres concentraciones de TSH (1 mUI, 10 mUI y 100 mUI), por 30 min,

1 hora y 2 horas. Posteriormente se realizó la extracción de RNA y se determinó la expresión de *NIS*, *TSHR* y *PDE8B*, las concentraciones de TSH que se escogieron fueron previamente reportadas en la literatura, y son concentraciones superiores a las fisiológicas⁵⁴⁻⁵⁶.

6.4.11 Cálculo para la determinación de la expresión relativa

Se determinó la expresión de los genes por medio del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, en el cual se tiene un grupo control y un gen de referencia para determinar las veces de cambio en la expresión relativa del gen problema.

$$\Delta\Delta C_t = (\text{Gen}_{\text{de interés}} - \text{Gen}_{\text{referencia}})_{\text{Grupo experimental}} - (\text{Gen}_{\text{de interés}} - \text{Gen}_{\text{referencia}})_{\text{Grupo control}}$$

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se reportaron como la media o mediana \pm error estándar (e.e.) para todos los datos. Se realizó la prueba de *t* de Student o U-Mann-Whitney. Se determinó una diferencia significativa con una $p \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism® versión 6.01 (GraphPad Software, Inc.).

▪ MÉTODO

Para la realización de este trabajo se siguieron los pasos establecidos en el diagrama de flujo (Fig. 10), y en la Tabla 6 se representan las variables independientes y dependientes de los experimentos realizados.

6.6 DIAGRAMA DE FLUJO

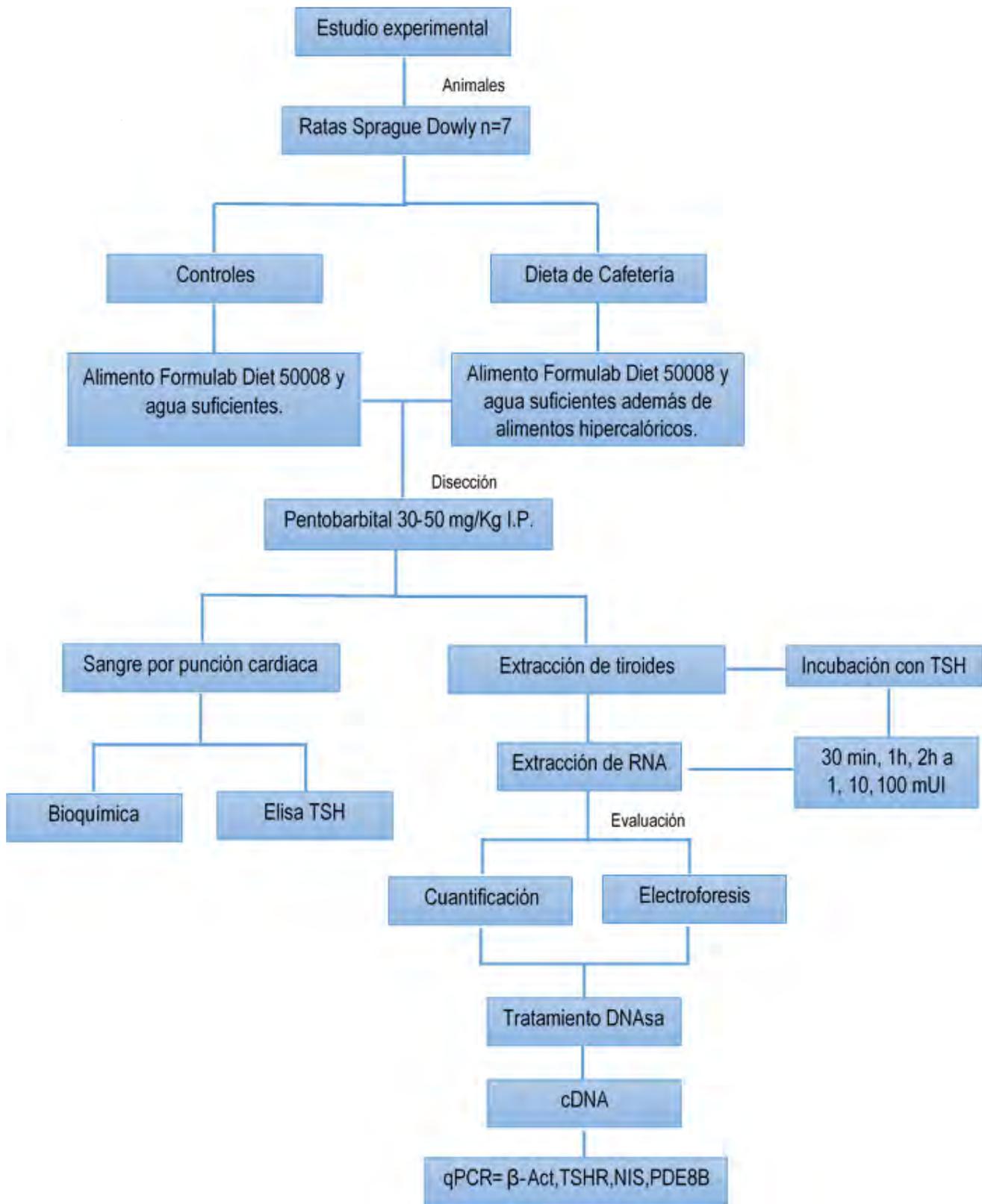


Fig. 10 Diagrama de flujo.

6.7 VARIABLE

Tabla 6 Variables independientes y dependientes de los experimentos a realizar.

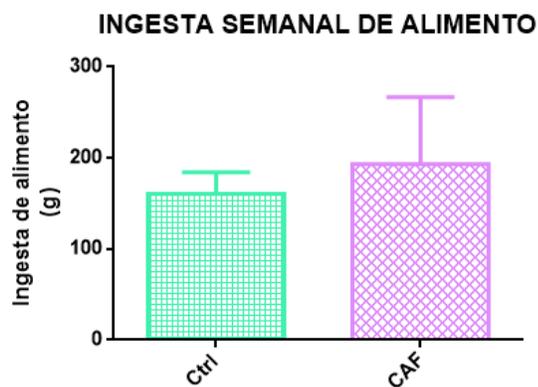
NOMBRE DE LA VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	INDICADOR	
VARIABLES INDEPENDIENTES			
Administración de dieta de cafetería	cualitativa nominal	Grupos: Control y Dieta de cafetería	Exposición a la dieta por 15 semanas.
VARIABLES DEPENDIENTES			
Ganancia de peso	Cuantitativa continua	g	Medición semanal del peso
Calorías consumidas	Cuantitativa continua	Kcal	Medición diaria del alimento consumido y cálculo de calorías
Perfil bioquímico	Cuantitativa continua	mg/dL,	Determinación de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL en suero.
Concentración de TSH	Cuantitativa continua	mUI/dL	Determinación de TSH en suero
Expresión génica	Cuantitativa continua	Expresión relativa con respecto al gen de referencia	Determinación de los cambios de expresión génica de <i>TSHR</i> , <i>NIS</i> y <i>PDE8B</i> con β -actina como gen de referencia.
Expresión génica en explantes de tiroides	Cuantitativa continua	Expresión relativa con respecto al gen de referencia	Determinación de los cambios de expresión génica de <i>TSHR</i> , <i>NIS</i> y <i>PDE8B</i> con β -actina como gen de referencia
VARIABLES INDEPENDIENTES			
Concentración de TSH para la incubación	Cuantitativa continua	1, 10 y 100 μ UI	
Tiempo de incubación	Cuantitativa continua	30 min, 1 h , 2 h	
Peso de la tiroides incubada	Cuantitativa continua	g	

7. RESULTADOS

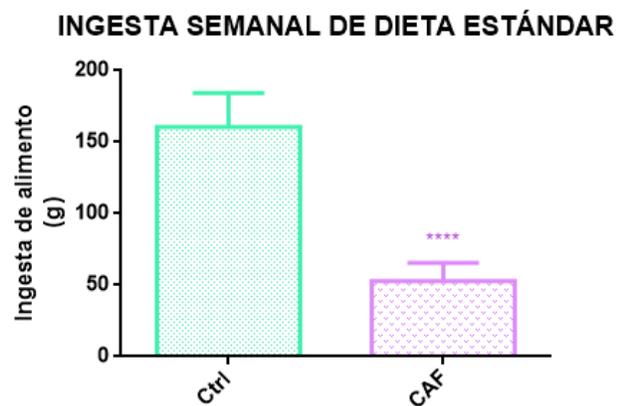
7.1 CONSUMO ENERGÉTICO

En este trabajo se empleó el modelo de dieta de cafetería para inducir obesidad en ratas Sprague-Dawley de tres meses de edad durante 15 semanas y al grupo control se le dio dieta estándar.

Se midió el consumo diario de alimento y agua, encontrándose con estos datos un aumento en el consumo semanal de alimentos en el grupo de cafetería, sin ser significativo (Gráf. 1). Siendo el consumo semanal de alimento estándar significativamente menor en el grupo de cafetería (Gráf. 2).

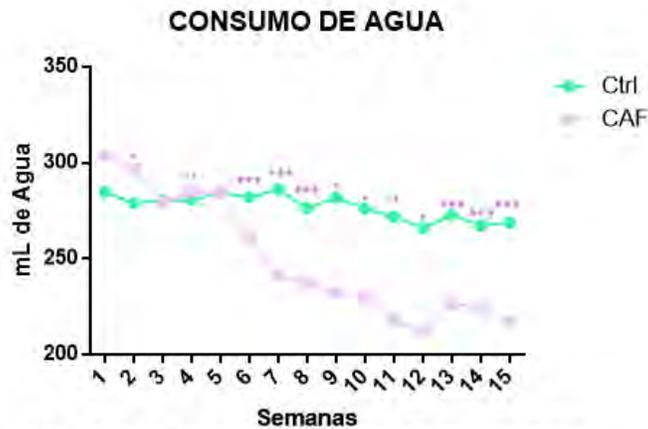


Gráf.1 Ingesta semanal de alimento (g) por rata, grupo control y grupo de cafetería (CAF), $p > 0.05$, $n = 7$.



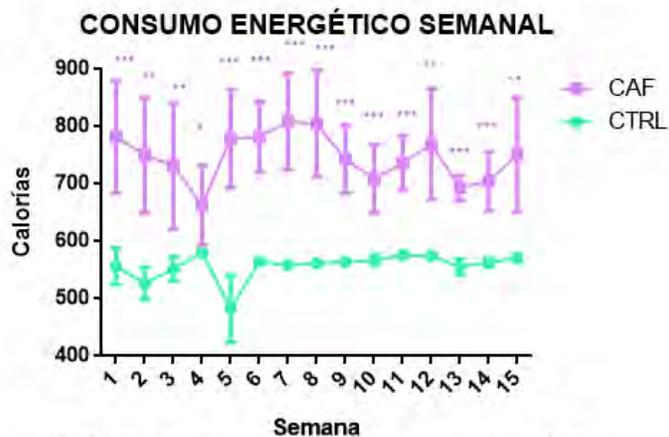
Gráf.2 Ingesta semanal de dieta estándar (g) por rata, grupo control y dieta de cafetería (CAF) **** $p < 0.0001$, $n = 7$.

Con respecto al consumo de agua se observó disminución significativa a partir de la semana seis, la cual se mantuvo hasta la semana 15 en el grupo de cafetería (Gráf. 3).



Gráf.3 Consumo semanal de agua por rata del grupo control y de cafetería (CAF) * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$ n=7.

Se realizó la medición semanal de las calorías consumidas para determinar que la dieta de cafetería fuera hipercalórica. Se encontró diferencia significativa desde la primera semana hasta las 15 semanas de experimentación, lo que indica que realmente la dieta de cafetería es hipercalórica con respecto a la dieta estándar del grupo control (Gráf. 4).

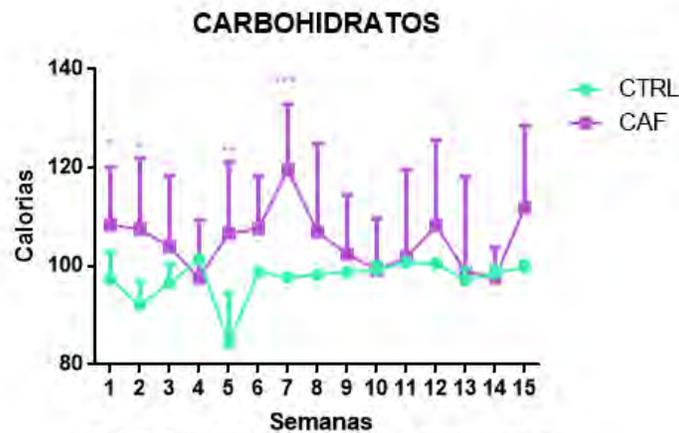


Gráf.4 Evaluación semanal del consumo energético total del grupo control y CAF * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$ n=7.

Para ver el consumo energético total ver anexos Gráf. I.

Se realizó el desglose de las calorías consumidas para identificar su procedencia, con el cual se identificó que el consumo semanal de carbohidratos fue elevado pero también muy variable con respecto a cada semana (Gráf. 5).

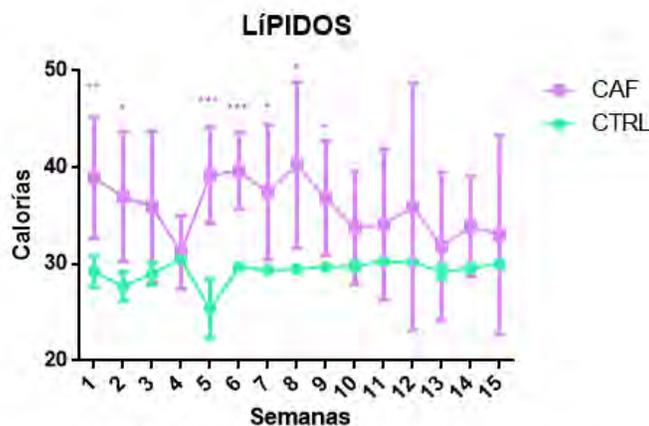
Al hacer el análisis de las calorías totales provenientes de carbohidratos se observó aumento significativo en el grupo de cafetería (Anexos Gráf. II).



Gráf.5 Evaluación semanal del consumo de carbohidratos entre el grupo control y grupo de cafetería *p≤0.05, **p≤0.01 y ***p≤0.0001, n=7.

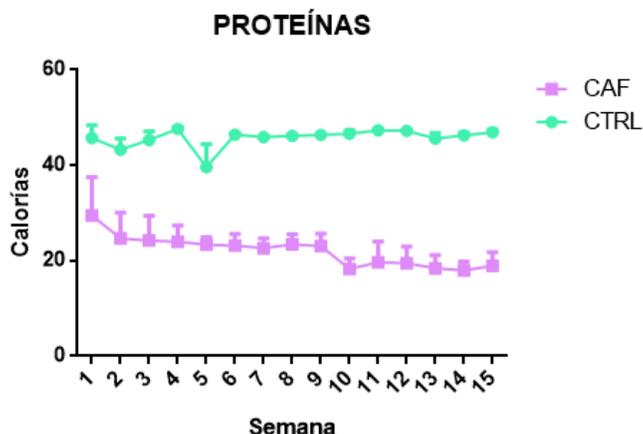
Con respecto al consumo de lípidos se encontró un aumento significativo en las primeras nueve semanas, posteriormente disminuyó; sin embargo, siempre fue mayor al consumo del grupo control (Gráf. 6). Al igual que con los carbohidratos, el consumo total fue significativamente mayor en el grupo de cafetería (Anexo Gráf.

III).



Gráf.6 Evaluación semanal del consumo de lípidos entre el grupo control y grupo de cafetería *p≤0.05, **p≤0.01 y ***p≤0.0001, n=7.

En el caso del consumo de proteínas los resultados muestran que la dieta de cafetería tiene un contenido significativamente menor que la dieta estándar (Gráf. 7).



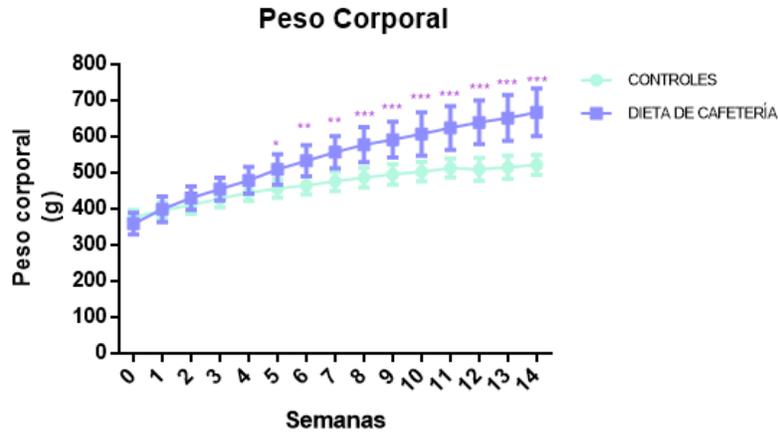
Gráf.7 Evaluación semanal del consumo de proteínas del grupo control y CAF * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$ n=7.

El consumo total de proteínas se encuentra en el anexo, Gráf. IV.

7.2 DATOS MORFOMÉTRICOS

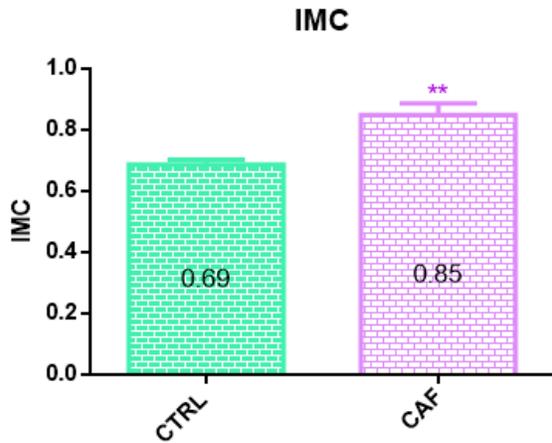
El principal objetivo de la dieta de cafetería es inducir obesidad, lo cual se determino por el peso corporal e índice de masa corporal (IMC).

Los resultados obtenidos muestran aumento significativo en el peso corporal a partir de la semana cinco, este se mantuvo hasta la semana quince en los animales de dieta de cafetería. Lo anterior demuestra que el modelo de dieta de cafetería promueve el incremento del peso corporal a las pocas semanas (Gráf. 8)⁴⁴.

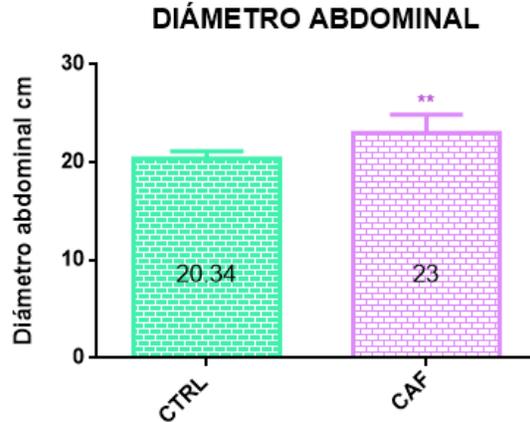


Gráf.8 Evaluación semanal del peso corporal, en el grupo control y de cafetería *p≤0.05, **p≤0.001 y ***p≤0.0001 n=7.

La determinación de los parámetros morfométricos de IMC y diámetro abdominal se realizaron de acuerdo a lo reportado por Novelli y cols.⁵². Se observó que a las 15 semanas de dieta tanto el IMC (0.85 y 0.69) como el diámetro abdominal (23 y 20.34 cm) fueron significativamente mayores en el grupo de cafetería con respecto al grupo control (Gráf. 9 y 10).



Gráf.9 Medidas del IMC del grupo control y grupo de cafetería ** p≤0.01 n=7.



Gráf.10 Medida promedio del diámetro abdominal en el grupo control y grupo de cafetería ** p≤0.01 n=7

7.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS DE LA TIROIDES

Tras la disección de los animales de experimentación, se realizó la comparación del tamaño de los lóbulos de la tiroides. En las fotografías 2 y 3 se muestran las tiroides de una rata del grupo control y de dieta de cafetería, respectivamente. Se identifican los dos lóbulos que constituyen a la tiroides, los cuales son simétricos y alargados lo que le confiere la apariencia de mariposa o moño de acuerdo con lo reportado en la literatura.

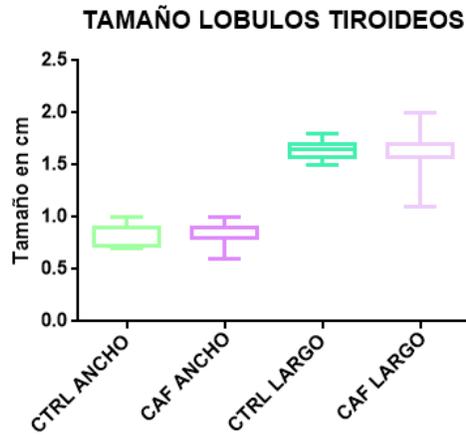


Fotografía 2 Tiroides grupo control.



Fotografía 3 Tiroides grupo dieta de cafetería.

De acuerdo a los resultados obtenidos el tamaño promedio de los lóbulos de la glándula tiroides en el grupo control es de 0.85 ± 0.0378 mm por 1.643 ± 0.02716 mm y el grupo de cafetería es de 0.8385 ± 0.02895 mm por 1.621 ± 0.06305 mm, no se observan cambios significativos en el tamaño de las tiroides (Gráf. 11).

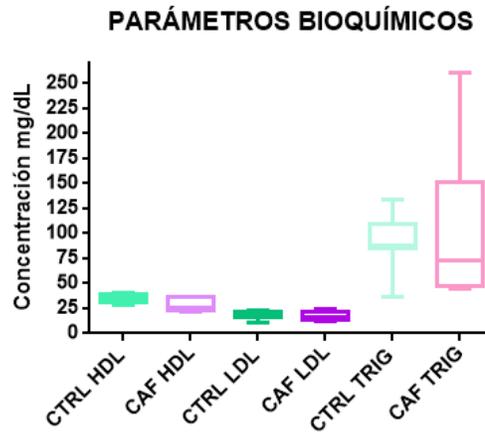


Graf. 11 Medidas del ancho y largo de los lobulos tiroideos, grupo control y grupo de cafetería $p>0.05$ $n=7$.

7.4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

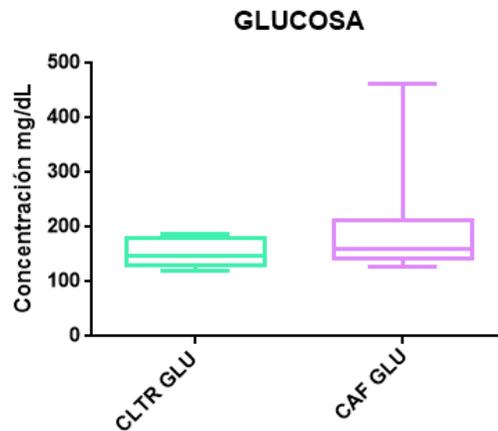
Se realizó la evaluación de los parámetros bioquímicos como el perfil lipídico (HDL, LDL y triglicéridos), glucosa, creatinina y los parámetros enzimáticos (ALT y AST), se analizaron con la prueba no paramétrica U-Mann-Whitney. Estos sirven para evaluar los cambios producidos por la dieta de cafetería en el metabolismo.

En el caso del perfil lipídico no se encontraron cambios significativos de HDL, donde los controles tuvieron una concentración de 31-39 mg/dL y el grupo de cafetería fue de 23-33 mg/dL. La concentración de LDL en el grupo control fue de 16-21 mg/dL y en el grupo de cafetería fue de 13-20 mg/dL (Gráf. 12). Mientras que los triglicéridos en el grupo de cafetería tuvieron un aumento, este no fue estadísticamente significativo, el grupo control tuvo una concentración de 85-109 mg/dL y en el grupo de cafetería es de 47-98 mg/ dL (Gráf. 12).



Gráf.12 Concentración de HDL, LDL y trigliceridos a los 3 meses de dieta, no se observan cambios significativos n=7 $p>0.05$.

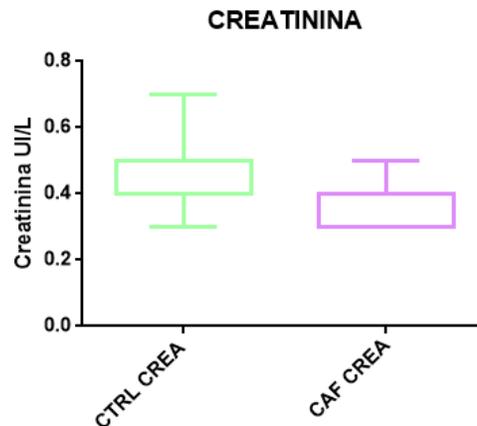
La concentración de glucosa en el grupo de cafetería fue mayor (143-213 mg/dL) con respecto al grupo control (131-180 mg/dL) aunque debido al error estándar no hubo una diferencia estadísticamente significativa (Gráf. 13).



Gráf.13 Concentración de la glucosa a los 3 meses, no se observo cambios significativos n=7 $p>0.05$.

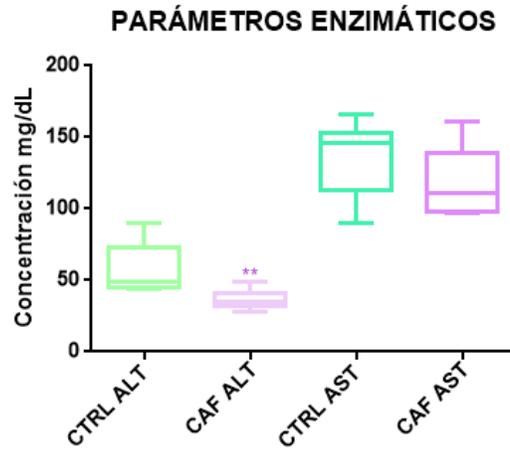
Se determinó la concentración sérica de creatinina como indicador de la disfunción renal, debido a que es un parámetro que se encuentra aumentado cuando los individuos tienen problemas a nivel de la filtración glomerular. Los resultados muestran una disminución en la concentración sérica de creatinina en el grupo de

cafetería, aunque esta no es estadísticamente significativa, la mediana para el grupo control fue de 0.3-0.5 UI/L, y en el grupo de cafetería fue de 0.3-0.5 UI/L (Gráf. 14).



Gráf.14 Concentración de la creatinina a los 3 meses, no se observo cambios significativos n=7 p>0.05.

Los parámetros enzimáticos se utilizan para evaluar el daño hepático. Los resultados de aspartato aminotransferasa (AST) no muestran cambios significativos entre el grupo control (113-153 mg/dL) y el grupo de cafetería (98-139 mg/dL). Mientras que la alanino aminotransferasa (ALT) tuvo una disminución significativa en el grupo de cafetería (32-41 mg/dL) con respecto al grupo control (45-73 mg/dL) (Gráf. 15).

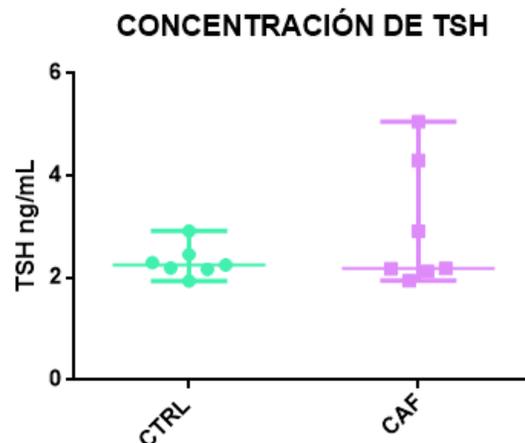


Gráf.15 Concentración de las enzimas hepáticas ALT y AST a los 3 meses, n=7 **p<0.01.

7.5 CONCENTRACIÓN SERICA DE TSH (ELISA)

Uno de los principales objetivos de este proyecto fue determinar si la obesidad inducida por la dieta de cafetería tenía consecuencias en el aumento de la TSH sérica, para lo cual se utilizó una prueba de ELISA.

Los resultados muestran que los niveles de TSH tienen una mediana de 2.17-2.46 ng/mL y de 2.13-4.30 ng/mL en el grupo control y de cafetería respectivamente. A pesar de que se observa aumento en los niveles de TSH por la dieta de cafetería, este cambio no es estadísticamente significativo ($p=0.2318$) (Gráf. 16).

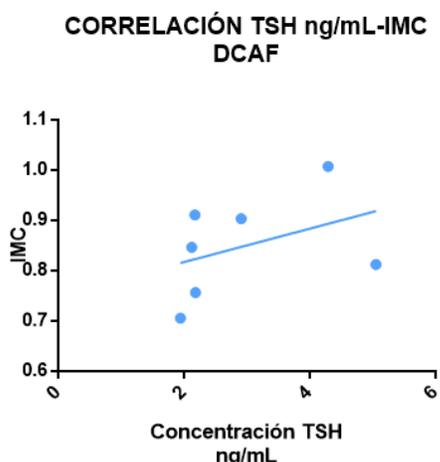


Gráf.16 Cuantificación de TSH por ELISA a los 3 meses de la dieta, grupo control y al dieta de cafetería $p>0.05$ n=7.

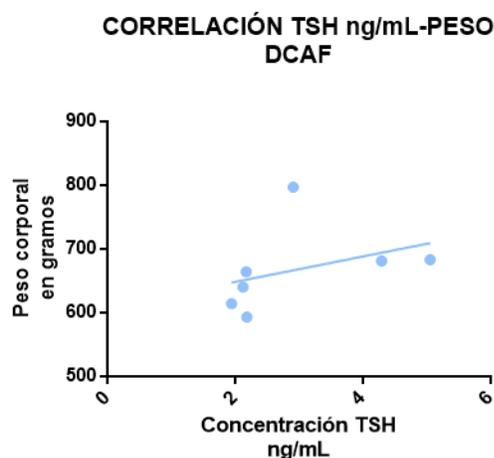
7.6 CORRELACIÓN ENTRE [TSH]-PESO Y [TSH]-IMC EN EL GRUPO DE DIETA DE CAFETERÍA

De acuerdo a los resultados obtenidos, de peso corporal, IMC y concentración sérica de TSH, se realizó la correlación de los parámetros morfométricos y la concentración de TSH, para identificar si el aumento de peso se podría relacionarse con el incremento de la concentración de TSH.

Los resultados muestran que la correlación de Spearman entre el nivel de TSH ng/mL-IMC en el grupo de dieta de cafetería fue de 0.679, siendo una correlación positiva aunque no significativa $p=0.110$ (Gráf. 17) y en la correlación con el peso corporal se observa el mismo comportamiento correlación de 0.393 siendo no estadísticamente significativo $p=0.397$ (Gráf. 18).



Gráf.17 Se observa que no existe una correlación entre el peso y la concentración de TSH, $r=0.4015$ y $p>0.05$.



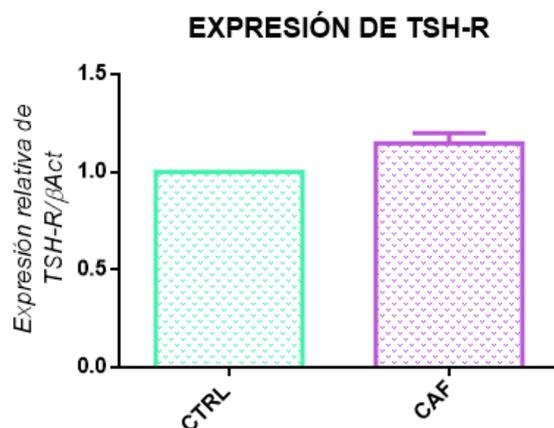
Gráf.18 Se observa que no existe una correlación entre el peso y la concentración de TSH, $r=0.3708$ y $p>0.05$.

7.7 EXPRESIÓN GÉNICA

Por medio de PCR en tiempo real se determinó la expresión relativa de *TSHR*, *NIS* y *PDE8B* en la tiroides de ambos grupos (CAF y controles), para conocer si la obesidad inducida por la dieta de cafetería genera cambios a nivel de expresión genética, los cuales puedan estar relacionados con el hipotiroidismo subclínico que se presenta en algunos pacientes con obesidad.

7.7.1 Expresión del receptor de TSH (*TSHR*).

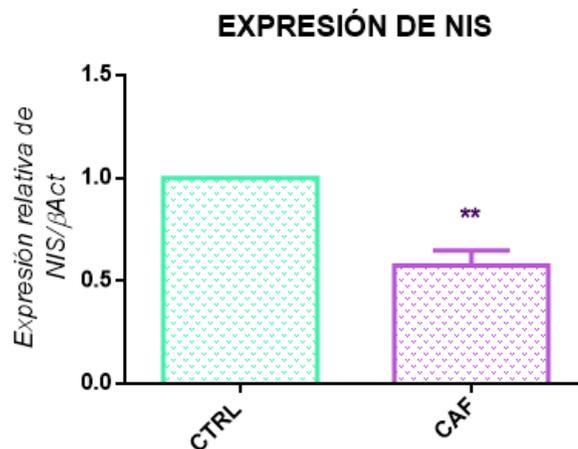
La expresión del receptor de TSH no se ha evaluado en la obesidad, aunque como ya se ha mencionado sus polimorfismos pueden asociarse con enfermedades tiroideas como el hipotiroidismo, por lo que se buscó determinar el efecto que tiene la dieta de cafetería sobre la expresión de este receptor. Los resultados muestran que hay un aumento aunque no es significativo ($p=0.056$) (Gráf. 19).



Gráf.19 Se observa un aumento en la expresión de TSH-R en tiroides, aunque no es significativo $p>0.05$ $n=5$.

7.7.2 Expresión del simportador de Na/I (NIS)

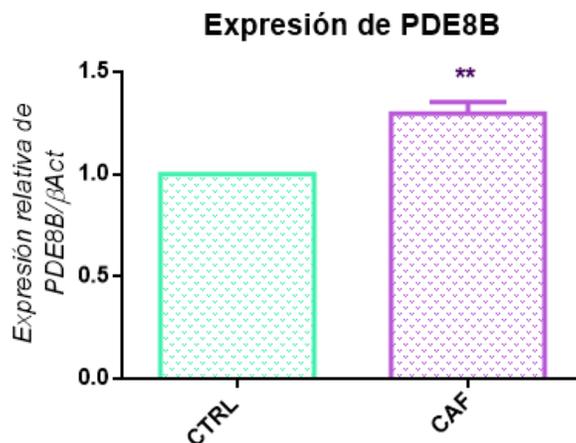
El simportador de sodio y yodo es el encargado de transportar el yodo necesario para la síntesis de las hormonas tiroideas por lo que la modificación en la expresión de este gen puede ser un indicador del efecto de la dieta de cafetería sobre la síntesis de estas. Los resultados muestran la disminución significativa (** $p=0.0022$) de *NIS* en el grupo de cafetería, lo cual podría relacionarse con alteraciones en la síntesis de hormonas tiroideas (Gráf. 20).



Gráf.20 Se observa una disminución significativa en la expresión de NIS en tiroides, ** $p<0.01$ n=6.

7.7.3 Expresión de la fosfodiesterasa 8B (PDE8B)

Se evaluaron también los cambios en la expresión de la fosfodiesterasa 8B ya que al ser la enzima encargada de hidrolizar al cAMP (segundo mensajero generado en la señalización de TSH para la síntesis de hormonas tiroideas), su modificación repercute en la síntesis de las hormonas tiroideas. Los resultados indican un aumento significativo en su expresión (** $p=0.006$) en el grupo de dieta de cafetería (Gráf. 21).



Gráf.21 Se observa un aumento en la expresión de PDE8B en tiroides, **p<0.01 n=5.

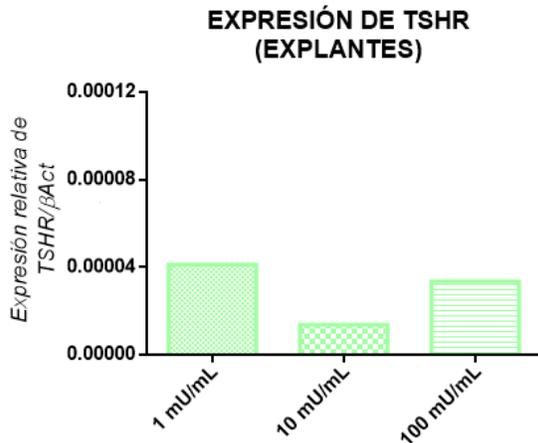
7.8 CAMBIOS EN LA EXPRESION DE EXPLANTES DE TIROIDES INCUBADOS CON TSH

Para determinar el efecto de concentraciones supra fisiológicas de TSH en la modificación de la expresión del *TSHR*, *NIS* y *PDE8B*, se realizaron experimentos *in vitro*, incubando explantes de tiroides con diferentes concentraciones de TSH.

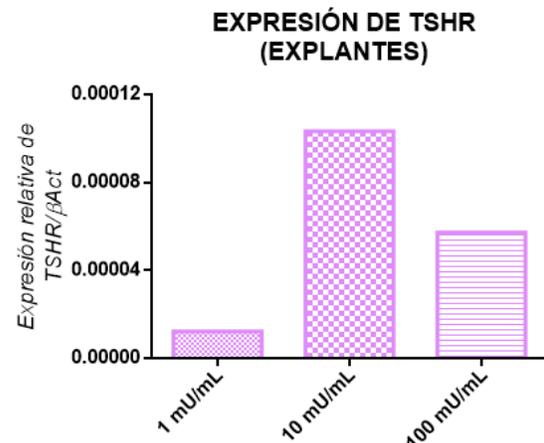
Los resultados obtenidos muestran cambios en la expresión a diferentes concentraciones de TSH (1 mUI, 10 mUI, 100 mUI). Para determinar el tiempo de incubación se eligió aquel en el cual había una mayor respuesta (Anexo Gráf. V-X).

7.8.1 EXPRESIÓN *TSHR* *in vitro*

Al incubar durante una hora con 1 mUI/mL, 10 mUI/mL y 100 mUI/mL de TSH, se observa que al aumentar la concentración de TSH la expresión de *TSHR* disminuye en el grupo control (Gráf. 22), mientras que en el grupo de cafetería tiende a aumentar la expresión siendo mayor a la encontrada en el grupo control (Gráf. 23).



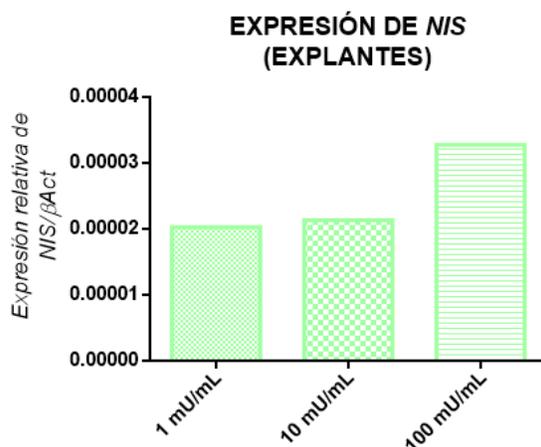
Gráf.22 Expresión relativa del TSHR en explantes de tiroides del grupo control, incubados durante 1 hora con TSH.



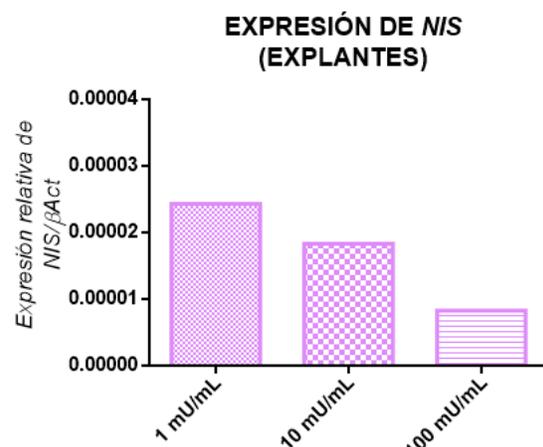
Gráf.23 Expresión relativa del TSHR en explantes de tiroides del grupo de cafetería, incubados durante 1h con TSH.

7.8.2 EXPRESIÓN NIS *in vitro*

Al igual que en TSHR el mayor cambio en la expresión de NIS se dio tras incubación una hora, observándose en el grupo control un aumento en la expresión de NIS al ir aumentando la concentración de TSH (Gráf. 24), siendo el efecto contrario al encontrado en el grupo de cafetería donde la expresión de NIS llega a niveles más bajos que los reportados en los controles (Gráf. 25).



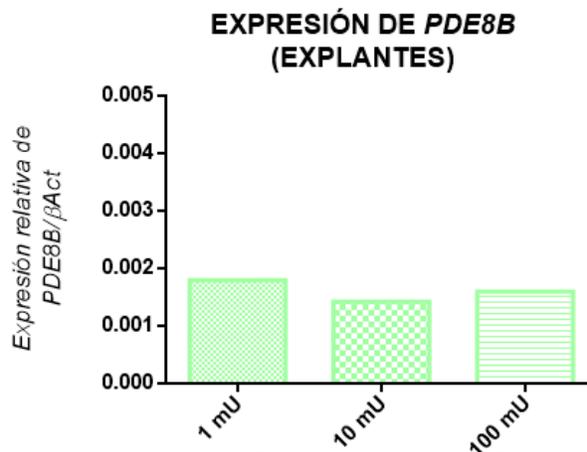
Gráf.24 Expresión relativa de NIS en explantes de tiroides del grupo control, incubados durante 1 h con TSH.



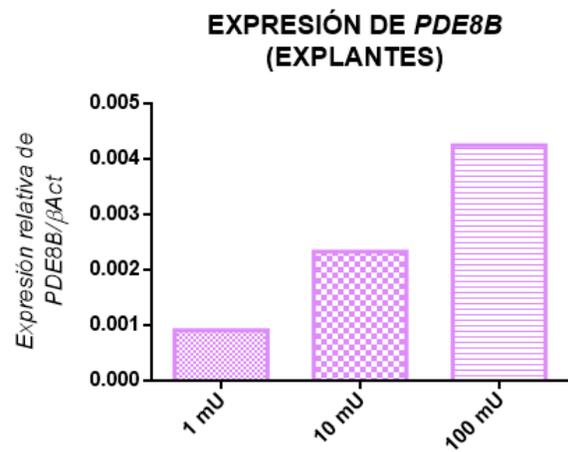
Gráf.25 Expresión relativa del NIS en explantes de tiroides del grupo de cafetería, incubados durante 1 h con TSH.

7.8.3 EXPRESIÓN *PDE8B* *In vitro*

Al realizar la incubación con las distintas concentraciones de TSH durante 30 min, se observó que efectivamente la expresión de *PDE8B* esta aumentada en el grupo CAF en comparación al grupo control. Sin embargo al aumentar la concentración de TSH, encontramos que la expresión de la fosfodiesterasa 8B aumenta de manera dependiente de la concentración en el grupo de cafetería; mientras que, en los controles esta permanece constante (Gráf 26-27).



Gráf.26 Expresión relativa de *PDE8B* en explantes de tiroides del grupo control, incubados durante 30' con TSH.



Gráf. 27 Expresión relativa de *PDE8B* en explantes de tiroides del grupo de cafetería, incubados durante 30' con TSH.

8. DISCUSIÓN

8.1 CONSUMO ENERGÉTICO Y DATOS MORFOMÉTRICOS

La obesidad va en aumento a nivel mundial debido al consumo de alimentos hipercalóricos, generalmente snacks o comida rápida que generan incremento en el IMC y en el tamaño de la circunferencia abdominal.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la dieta de cafetería fue capaz de aumentar el peso corporal en las ratas, debido a una mayor ingesta de productos con alto contenido calórico. De acuerdo a los datos, esta ganancia de peso es producida por un mayor contenido de lípidos y carbohidratos, y bajo contenido de proteína en la dieta, en comparación con el grupo control. Siendo similar a lo reportado previamente por otros trabajos ⁴²⁻⁴⁴.

El consumo energético promedio fue 34.2% mayor en el grupo de cafetería (Gráf. 4 anexo Gráf. I). En cuanto a las calorías provenientes de carbohidratos se aumentó un 7.89% (Gráf. 5 anexo Gráf. II) y de lípidos el 16.04% en promedio (Gráf. 6 anexo Gráf. III). Por otro lado las dietas altas en grasas aumentan un 10% el consumo ³⁷.

El consumo de proteínas fue significativamente menor en el grupo de cafetería, con respecto al grupo control, del 43.88% (Gráf. 7 Anexo Gráf. IV). Se ha reportado que una dieta baja en proteínas genera problemas de hipertensión y resistencia a la insulina, efectos semejantes a los que ocurren en modelos de obesidad, aunque pueden suceder por vías distintas ⁵⁷.

Por el contrario, se ha demostrado que las dietas altas en proteínas aumentan la saciedad, de acuerdo a lo reportado por la escala análoga visual (VAS por sus siglas

en inglés), esto ocasiona una disminución del apetito, por lo que algunas dietas como Atkins, South Beach, Stillman, y the Zone reducen la cantidad de carbohidratos y aumentan las proteínas para disminuir de peso. Aunque ya se ha observado que aun sin disminuir la cantidad de carbohidratos consumidos el aumento de proteínas consumidas cumple este objetivo ⁵⁸. El incremento de la saciedad en este tipo de dieta está relacionado con el efecto térmico producido por la ingesta de alimentos, el cual afecta el balance energético siendo mayor en las proteínas con un 15-30%, mientras que es de un 5-10% en carbohidratos y 0-3% en lípidos ⁵⁸. Este efecto térmico se ve disminuido en la obesidad ⁵⁹.

Además, se ha observado que una dieta alta en proteínas modula la reducción de la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática ⁶⁰. Por lo que la disminución en el consumo de proteínas por parte del grupo de cafetería tiene una gran relevancia para generar un exceso de peso corporal y favorecer características propias del síndrome metabólico. Por el contrario, si se usara una dieta alta en proteínas, se reducirían los efectos causados por la dieta de cafetería principalmente respecto al aumento de peso. Ya que también se ha notado que una dieta alta en proteínas tiene menor masa grasa corporal en relación a una dieta baja en proteínas ⁶¹.

El índice de masa corporal (IMC), se ha propuesto como un índice para determinar obesidad en humanos, en el cual considera la masa y la talla de los individuos ($IMC = \text{peso} / \text{estatura}^2$). De acuerdo a la OMS un IMC de 18.5-24.99 se considera normal, mientras que valores ≥ 30 ya se consideran como obesidad ¹. Sin embargo, aunque el cálculo de IMC en ratas se hace de manera similar ($IMC = \text{peso} / \text{talla}^2$), no existen puntos de corte para considerar valores normales u obesidad, ya que esto está en

función de la edad, la cepa de los animales y el tipo de modelo para producir obesidad. Novelli y cols. (2007)⁵² reportaron que durante el crecimiento las ratas Wistar llegan a tener un IMC de 0.68, el cual se mantiene sin cambios significativos a partir del cuarto mes de edad. Mientras que, los animales a los que se les proporciona una dieta alta en grasa o en sacarosa, su IMC puede aumentar hasta 0.72 o 0.82 respectivamente⁵². Estos valores coinciden con los resultados que se obtuvieron en este trabajo, donde el valor de IMC para el grupo control fue de 0.69 y para el grupo de dieta de cafetería de 0.85 (Gráf. 9), el cual fue más parecido a 0.82 del grupo de sacarosa y mayor al grupo de dieta alta en grasa 0.72 ambos reportados por Novelli y cols. (2007)⁵².

Con respecto al diámetro abdominal Novelli y cols. (2007), registraron que las ratas Wistar adultas, pueden llegar a tener una circunferencia de 17.2 cm, mientras que el grupo de sacarosa aumenta su diámetro a 22.1 cm. En este modelo, se observó que el grupo de cafetería presentó el diámetro de 23 cm, significativamente mayor al obtenido por el grupo control (20.34 cm) (Gráf. 10). En los dos grupos el diámetro abdominal fue mayor a los valores reportados previamente, posiblemente estos cambios puedan ser debidos a que se utilizaron diferentes cepas de animales.

Los resultados obtenidos en este trabajo, así como los reportados en la literatura coinciden en que la dieta de cafetería puede ser un buen modelo para la inducción de obesidad en animales.

8.2 TAMAÑO DE TIROIDES

Al evaluar si la obesidad produce cambios morfológicos en la tiroides, Shao SS y cols. (2014), realizaron un ultrasonido de alta frecuencia con el cual identificaron diferencias significativas del volumen lobular y tiroideo al comparar el grupo de dieta alta en grasa con el grupo control, además de rasgos heterogéneos³⁷. Sin embargo, en este estudio no se encontró cambios significativos en el tamaño promedio de los lóbulos de la glándula tiroides al comparar ambos grupos. Lo que sugiere que la obesidad inducida por dieta de cafetería no es capaz de generar cambios morfológicos en la tiroides durante las 15 semanas que duró la dieta. Aunque sería interesante evaluar estos cambios en tiempos de exposición a la dieta más prolongados.

8.3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se realizó la evaluación de los niveles séricos de glucosa, perfil lipídico (HDL, LDL y triglicéridos), creatinina y parámetros enzimáticos (AST y ALT).

Dentro del perfil bioquímico no se encontraron cambios significativos entre ambos grupos, de acuerdo a artículos donde se utilizan modelos de obesidad el HDL no sufre cambios significativos, sin embargo en el LDL y triglicéridos se ha reportado aumento, a pesar de que el caso de triglicéridos se observa un aumento, no es significativo debido al error estándar para lo cual es necesario aumentar el tamaño de muestra (Gráf.12). También el que no haya cambios en HDL y LDL puede deberse al poco tiempo de exposición a la dieta.

En el caso de la glucosa, existe un aumento pero este no es significativo (Gráf. 13), de acuerdo a Macedo y cols. (2012)⁴² en ratas con dieta alta en grasa los valores

de glucosa son de 71.4 mg/dL mientras que en los controles fue de 67.92 mg/dL, aunque los valores de este trabajo fueron mucho mayores que los reportados, se toma en cuenta que Macedo y cols. no encontraron cambios significativos además que el tiempo de dieta fue mucho menor ⁴².

La creatinina sérica elevada es un marcador de disfunción renal, es un residuo aminoácido que indica el filtrado glomerular. No obstante, los resultados indican que el grupo de cafetería presentó una disminución significativa con respecto al grupo control. Esto se puede explicar debido a que la creatinina está relacionada con la ingesta proteica y con la masa muscular del individuo ⁶², en padecimientos como distrofia muscular, en donde los individuos tienen una menor masa muscular se han encontrado valores disminuidos de creatinina ⁶³. Lo anterior se puede relacionar con una disminución de la masa muscular en las ratas de dieta de cafetería y su aumento de masa grasa (Gráf. 14).

En el caso de los parámetros enzimáticos, la aspartato aminotransferasa (AST) no presentó cambios significativos. Mientras que la alanino aminotransferasa (ALT) tuvo disminución significativa en el grupo de cafetería. Estas pruebas evalúan la función hepática siendo sensibles para el daño hepatocelular, especialmente ALT ⁶⁴. En los resultados se encontró que hay una disminución significativa de ALT en el grupo de cafetería, aunque generalmente el aumento es el indicador del mal funcionamiento se han reportado que su disminución puede estar relacionada con hígado graso no alcohólico (Gráf. 15) ⁶⁵.

8.4 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TSH

Se ha descrito ampliamente que durante la obesidad se puede generar una disfunción tiroidea trayendo como secuencia el aumento de la concentración sérica de la TSH. También, los niveles de TSH se correlacionan significativamente con un aumento en el IMC. Aunque los mecanismos para que se lleve a cabo este fenómeno no están del todo claro, se ha propuesto que esto se debe a la estimulación de leptina en el hipotálamo o por las citosinas proinflamatorias producidas debido a la inflamación crónica generada de bajo grado ^{40,41}. Se han sugerido otros factores causales del aumento de TSH en la obesidad, por ejemplo, la dieta. Se ha descrito que el consumo de alimentos hipercalóricos con alto contenido en grasas, además de producir obesidad, contribuyen a generar complicaciones a nivel metabólico, como hipertensión, diabetes etc. ⁴². En este sentido, se ha reportado que la dieta alta en grasa puede producir cambios en la función tiroidea, generando aumento de TSH y disminución de T4 y T4L ⁴⁰.

Los resultados muestran incremento en los niveles de TSH en el grupo de cafetería con respecto al grupo control (Gráf. 16), además de una correlación positiva entre los niveles de TSH con el IMC y el peso corporal (Gráf. 17-18), sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. A pesar de que el 30% de la población que consumió la dieta de cafetería si presentó niveles elevados de TSH (Gráf. 16). Posiblemente, sea necesario aumentar el tiempo de exposición a la dieta de cafetería para poder observar cambios significativos en el aumento de TSH, ya que en otros trabajos en los que utilizan una dieta alta en grasa, observan cambios significativos en los niveles de TSH entre las 18-24 semanas de dieta ³⁷.

8.5 EXPRESIÓN GÉNICA DE *TSHR*, *NIS*, *PDE8B*

Aunque se ha descrito que el hipotiroidismo subclínico es una enfermedad que se caracteriza por una concentración elevada de TSH sin alteraciones en los niveles de las hormonas tiroideas, existen estudios que indican que los niveles de TSH por tiempos prolongados, pueden llegar a modificar la síntesis de hormonas tiroideas, generándose así el hipotiroidismo clínico ²⁷. En los pacientes con obesidad mórbida ya se ha reportado una incidencia del 48.5% que presentan valores elevados de TSH ⁵¹. Aunque aún existe la discrepancia entre si el IMC tiene una correlación positiva con la TSH sérica ⁴¹.

Se decidió evaluar la expresión del receptor de TSH debido a que no existen datos sobre los cambios que ocurren durante la obesidad a nivel tiroideo. Se evaluó la expresión de *NIS* debido a su importancia como transportador, encargado de captar el yodo extracelular para la síntesis de las HT, y a *PDE8B* por ser el encargado de hidrolizar cAMP segundo mensajero producido tras la unión de TSH con su receptor ^{8,11,22,24,25}, la alteración de estos genes en la obesidad genera información importante sobre lo que sucede en la señalización de TSH.

Los resultados indican un aumento en la expresión del receptor de tirotropina (*TSHR*), aunque no fue estadísticamente significativo (Gráf. 19). Sin embargo, esta tendencia que se mantiene al determinar la expresión de *TSHR* en explantes de tiroides incubados con TSH. Por el contrario en el grupo control se observa la tendencia a disminuir la expresión tras aumentar el estímulo con TSH (Gráf. 22-23). En estudios previos en tiroides no se había evaluado la expresión de este gen únicamente se habían evaluado polimorfismos; donde se ha reportado que si el

polimorfismo inactiva a TSHR se produce hipotiroidismo, y si lo activa se produce hipertiroidismo ⁵⁶.

Con respecto a la expresión del simportador de sodio/yodo (*NIS*), se observó una disminución significativa $**p=0.0022$ (Gráf. 20), en el grupo de cafetería. De acuerdo a los resultados de la incubación de explantes se muestran que al estimular durante 1 hora con 100 mUI/mL de TSH, la expresión de *NIS* en el grupo de cafetería se disminuye, mientras que en el grupo control es el tiempo al que la expresión deja de ser constante y se observa aumento (Anexo Gráf. VII-VIII). Con la exposición durante una hora con las distintas concentraciones de TSH empleadas se observó una disminución dependiente de la concentración en la expresión de *NIS* en el grupo de cafetería. Sin embargo, en el grupo control se identificó que se mantenía la tendencia a aumentar tras un estímulo mayor (Gráf. 24-25). De forma habitual se ha reportado que la TSH estimula la transcripción y cambios post-transducciones de *NIS* por la estimulación con TSH ^{34,66}, lo cual se identificó en el grupo control, aunque, los resultados en este trabajo muestran un efecto contrario en el grupo de cafetería lo que indicaría la influencia de la obesidad sobre a expresión de *NIS*, aunque se requieren realizar más experimentos para identificar si hay cambios a nivel transcripcional y su repercusión a nivel post-transduccional (Gráf. 24-25).

Por otro lado, se observó aumento significativo en la expresión de PDE8B en el grupo de cafetería (Gráf. 21), lo que se corroboró *in vitro*, ya que la estimulación por 30 min con TSH a las distintas concentraciones indican una disminución de la expresión la cual al estimularse con una mayor concentración se estimula

positivamente en el grupo de cafetería, mientras que en el grupo control permanece constante (Gráf. 26-27).

Los niveles elevados de leptina durante la obesidad se asocian con la estimulación de pro-TRH la cual a su vez estimula la síntesis de TSH, considerándose así el paso central del aumento de TSH ^{41,67}. Mientras que los SNPs asociados a la modificación de la actividad de PDE8B se han considerado como una vía periférica del aumento de TSH ^{49,67}, lo anterior debido a que si hay un aumento de PDE8B se inhibe la señalización de TSH, lo cual se trata de compensar con el aumento de TSH, para así mantener la homeostasis de las HT en sangre ^{20,49}.

Los resultados de este estudio indican que el grupo de cafetería genera una sobre expresión significativa de *PDE8B*, acción que se relaciona con el aumento en los niveles de TSH característica de pacientes con obesidad, siendo este aumento un mecanismo compensatorio en la señalización de TSH.

Los resultados sugieren que la obesidad inducida por la dieta de cafetería genera cambios en la expresión de *NIS* y *PDE8*, dos genes clave en la síntesis de hormonas tiroideas. Por una parte, la disminución en la expresión de NIS principal simportador de yodo requerido para la síntesis de hormonas tiroideas; y por otro lado, el aumento de la fosfodiesterasa la cual es una enzima que se encarga de hidrolizar al cAMP, el segundo mensajero que se encarga de la señalización de TSH en el tirocito para activar la expresión de *NIS* tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional ^{47,66}. Además de regular la endocitosis de la tiroglobulina y la secreción de las hormonas tiroideas ²⁰.

9. CONCLUSIONES

- La dieta de cafetería es un modelo eficaz para producir obesidad, al generar un aumento significativo de peso corporal e IMC con respecto al grupo control que sólo consumió la dieta estándar.
- El aumento en el IMC tiene una correlación positiva con la concentración de TSH aunque no es estadísticamente significativa. Si bien se observa aumento en sus niveles a las 15 semanas es necesario realizar una exposición más prolongada para encontrar niveles séricos elevados en un mayor porcentaje de la población.
- La obesidad inducida por dieta de cafetería disminuyó significativamente la expresión de *NIS*, mientras que a la expresión de fosfodiesterasa 8B aumentó. Estas alteraciones fueron más evidentes después de incubar el tejido con TSH.
- Los resultados obtenidos sugieren que la obesidad puede producir modificaciones en la tiroides que afectan la expresión de genes clave en la regulación de la síntesis de hormonas tiroideas.
- Estas modificaciones nos indican las posibles alteraciones en la tiroides que conllevan a una desregulación en la síntesis de hormonas tiroideas a pesar del aumento de TSH sérica. Sin embargo, aún se necesitan más experimentos para demostrar esta hipótesis.

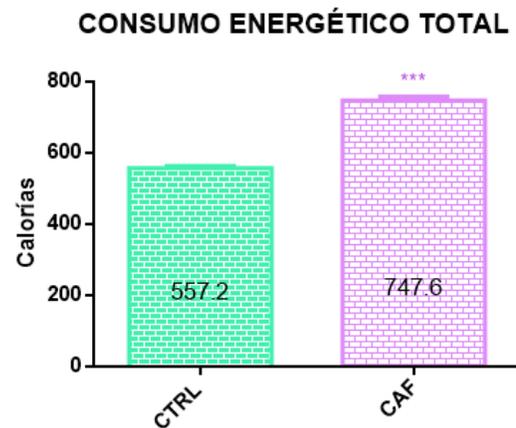
10. PERSPECTIVAS

- Aumentar el tiempo de exposición de la dieta de cafetería.
- Aumentar la “n” para identificar si la tendencia observada es significativa en la expresión de *TSHR*.
- Cuantificar la concentración sérica de T3, T4 libre (T4L) y evaluar el índice de T3L/T4L.
- Realizar la determinación de TSH sérica basal, otra medición a la mitad de la exposición a la dieta y al terminar para determinar las variaciones en la concentración de TSH.
- Medir niveles séricos de leptina y su correlación con la concentración sérica de TSH.
- Realizar la incubación con TSH a concentraciones inferiores y con un mayor número de muestras.
- Realizar cortes histológicos de la tiroides para determinar cambios morfológicos.
- Determinar la expresión de los receptores de TSH y NIS por inmunofluorescencia.
- Evaluar la correlación entre la expresión de mRNA de NIS y el estado de inflamación citosinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 , IL-6 etc.).

11. ANEXOS

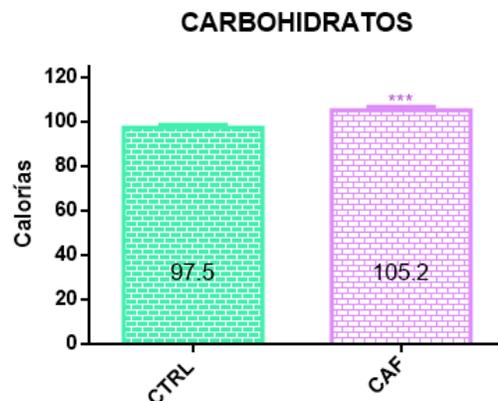
11.1 CONSUMO ENERGÉTICO

El consumo energético total fue de 556.2 calorías para el grupo control mientras que para el grupo de dieta de cafetería fue de 747.6 calorías, siendo estadísticamente significativo el aumento de calorías consumidas en el grupo de cafetería (Gráf. I).



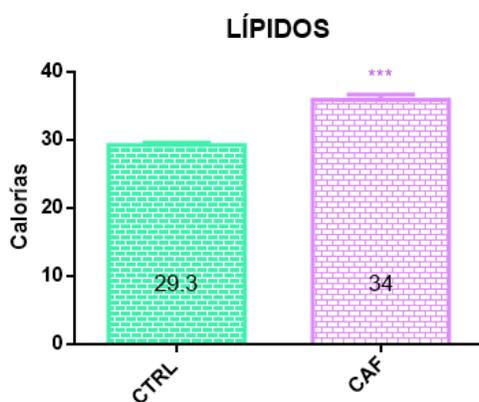
Gráf. I Se observa un aumento significativo en el consumo energético total por rata siendo mayor en el grupo de dieta de cafetería (CAF), *** $p \leq 0.0001$ $n=7$.

El consumo total de carbohidratos en el grupo de cafetería fue significativamente mayor (Gráf. II).



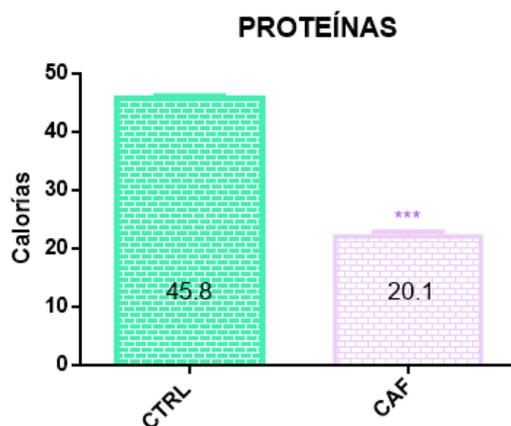
Gráf. II Se observa un aumento significativo en el consumo de carbohidratos totales por rata siendo mayor en el grupo de dieta de cafetería (CAF), *** $p \leq 0.0001$, $n=7$.

En cuanto al consumo total de lípidos consumidos por cada rata, este también se vio incrementado significativamente, siendo estos dos componentes los que le brindan a la dieta su contenido hipercalórico (Gráf. III).



Gráf. III Se observa un aumento significativo en el consumo de lípidos totales por rata siendo mayor en el grupo de dieta de cafetería (CAF), *** $p \leq 0.0001$, $n=7$.

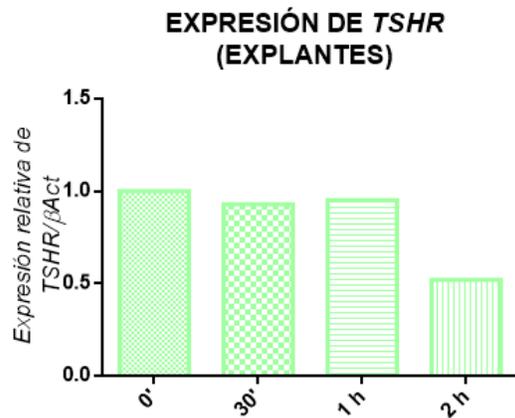
Mientras tanto el contenido proteico ingerido por el grupo de cafetería fue significativamente menor que el grupo control (Gráf. IV).



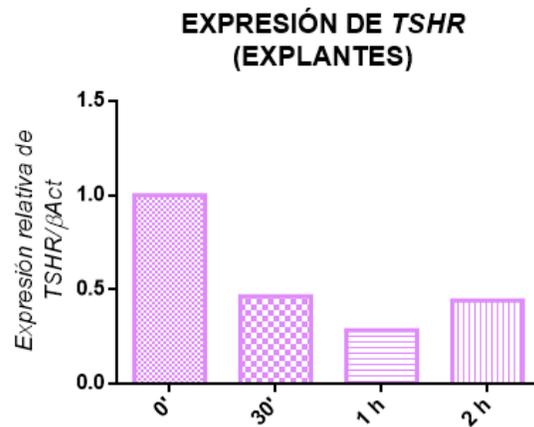
Gráf. IV Se observa una diferencia significativa en el consumo de proteínas totales por rata siendo menor en el grupo de dieta de cafetería (CAF), *** $p \leq 0.0001$, $n=7$.

11.2 EXPRESIÓN GÉNICA EXPLANTES TIROIDEOS

Dentro de las pruebas preliminares que se hicieron para encontrar el tiempo óptimo de incubación, se encontró que a la hora había el cambio más grande en la expresión de *TSHR* con respecto al tiempo cero en el grupo de cafetería y fue este el tiempo que se escogió para realizar la incubación a diferentes concentraciones, además se observó que el grupo control se mantiene constante hasta las dos horas donde comienza a observarse la disminución de la expresión de *TSHR* (Gráf. V-VI).



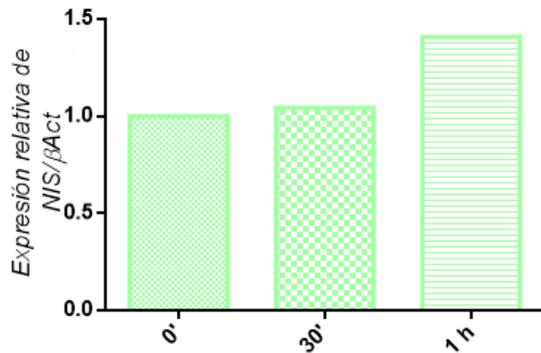
Gráf. V Expresión relativa del TSHR en explantes de tiroides del grupo control, incubados con TSH 1 mU.



Gráf. VI Expresión relativa del TSHR en explantes de tiroides del grupo de cafetería, incubados con TSH 1 mU/mL

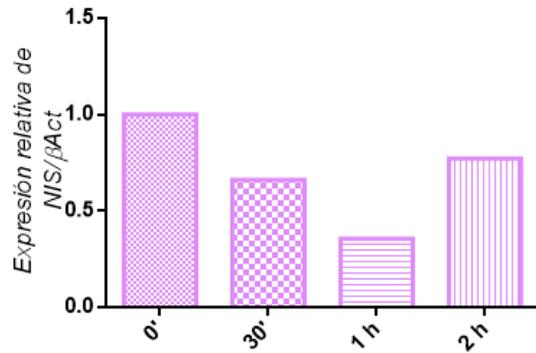
En cuanto al tiempo óptimo para evaluar la expresión de *NIS* se encontró que a la hora también se presentaba el mayor cambio en la expresión del grupo control siendo un aumento mientras que en este mismo tiempo el grupo cafetería presentaba una disminución, por lo cual se eligió este tiempo para evaluar distintas concentraciones (Gráf. VII-VIII).

EXPRESIÓN DE NIS (EXPLANTES)



Gráf. VII Expresión relativa del NIS en explantes de tiroides del grupo control, incubados con TSH 100 mU/mL.

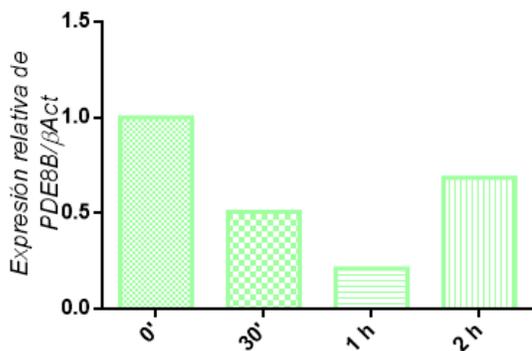
EXPRESIÓN DE NIS (EXPLANTES)



Gráf. VIII Expresión relativa del NIS en explantes de tiroides del grupo de cafetería, incubados con TSH 100 mU/mL.

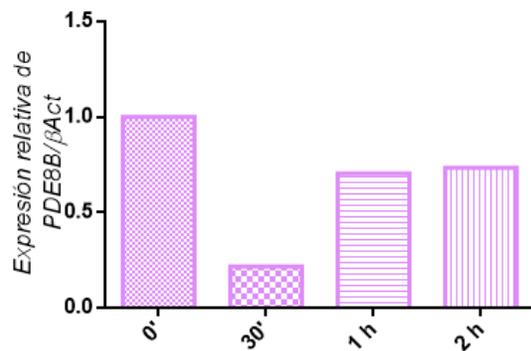
Mientras que la expresión de *PDE8B* el cambio más grande se presentó a los 30 minutos, aunque en el grupo control esta disminución se da hasta la hora sin embargo, posteriormente comienza una recuperación de los niveles de expresión en ambos grupos (Gráf. IX-X).

EXPRESIÓN DE *PDE8B* (EXPLANTES)



Gráf. IX Expresión relativa del PDE8B en explantes de tiroides del grupo control, incubados con TSH 1 mU/mL.

EXPRESIÓN DE *PDE8B* (EXPLANTES)



Gráf. X Expresión relativa del PDE8B en explantes de tiroides del grupo de cafetería, incubados con TSH 1 mU/mL.

12. REFERENCIAS

1. OMS. Organización Mundial de la salud [Internet]. 2016 [citado el 2 de Agosto del 2016]. Disponible en : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
2. Gutiérrez JP, River J, Shamah T, Villalpando S, Franco A, Cuevas L, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
3. Hernández M, Rivera J, Shamah T, Cuevas L, Gómez LM, Gaona EB, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe final de resultados. México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2016.
4. Rivolta MC, Esperante S, Gutniskky V, Varela V, Targovnik H. La tiroides como modelo de mecanismos moleculares en enfermedades genéticas. *Medicina*. 2015; 65:257-67.
5. Longhi S, Radetti G. Thyroid function and obesity. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* 2013; 5(1):40-4.
6. Pearse EN. Thyroid hormone and obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* 2012; 19(5):408-13.
7. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 316(2):165-71.
8. Biondi B. Thyroid and obesity: an intriguing relationship. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010; 95(8):3614-7.
9. Fox G. *Fisiología humana*. México: Mc Graw Hill; 2011.
10. Tortora G, Derrickson B. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11 a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2006.
11. Rhoades R, Bell B. *Fisiología Médica fundamentos de medicina clínica*. 4a ed. México: Wolters Kluwer Lippicott Williams & Wilkins; 2012.
12. Bianco AC, Maia AL, Da Silva WS, et al. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep.* 2005; 25:191–208.
13. Laway BA, War FA, Shah S, et al. Alteration of lipid parameters in patients with subclinical hypothyroidism. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 2014; 12(3):1-4.
14. Abdalla SM, Bianco AC. Defending plasma T3 is a biological priority. *Clin. Endocrinol.* 2014; 81(5):633-41.
15. Fonseca TL, Corre M, Campos MP, et al. Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(4):1492-500.
16. De Lloyd A, Bursell J, Gregory JW, et al. TSH receptor activation and body composition. *J. Endocrinol.* 2010; 204(1):13-20.
17. Frohlich E, Wahl R. Mechanisms in endocrinology: Impact of isolated TSH levels in and out of normal range on different tissues. *Eur. J. Endocrinol.* 2016; 174(2):R29-41.
18. Yen PM. Thyrotropin receptor mutations in thyroid diseases. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2000; 1(1389-9155):123-9.
19. Polonsky KS, Kronenberg HM, Larsen, PR, et al. *Williams: Tratado de Endocrinología*. 12va ed. Estados Unidos: Elsevier – Saunders; 2011.
20. Arnaud L, Usala G, Ceresini G, et al. Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am. J. Hum. Genet.* 2008; 82(6):1270-80.
21. Gereben B, Zeold A, Dentice M, et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2008; 65(4):570-90.

22. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, et al. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2014; 13(4):290-314.
23. Manganiello V. Short-term regulation of PDE4 activity. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136(3):339-40.
24. Reneerkens OA, Rutten K, Steinbusch HW, et al. Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement. *J. Psychopharmacol.* 2009; 202(1-3):419-43.
25. Medici M, Van der Deure WM, Verbiest M., et al. A large scale association analysis of 68 thyroid hormone pathway genes with serum TSH and FT4 levels. *Eur. J. Endocrinol* 2011; 164:781-8.
26. Pinto A GM. Management of patients with thyroid disease. *JADA.* 2002; 133:849-58.
27. Pérez G VA, Barrera A, Venezuela A, et al. Diagnóstico y tratamiento de hipotiroidismo primario y subclínico en el adulto. México: IMSS; 2016.
28. Muños C GJ, Martínez E, Domínhurx MO, . Tratado de geriatría para residentes. Hipo e Hipertiroidismo Madrid: SEGG; 2016.
29. Helfand RC. Screening for thyroid disease: An update. *Ann. Intern. Med.* 1998; 129:144-58.
30. Bergoglio MJ. Guía de consenso para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad tiroidea. Estados Unidos: NACB; 2002.
31. Association TAT. Pruebas de función tiroidea 2017 [citado el 17 de mayo 2017]. Disponible en:
https://www.thyroid.org/wpcontent/uploads/patients/brochures/espanol/pruebas_funcion_tiroidea.pdf.
32. Association TAT. Hipotiroidismo U.S. 2017 [citado el 17 de mayo 2017]. Disponible en:
<https://www.thyroid.org/wpcontent/uploads/patients/brochures/espanol/hipotiroidismo.pdf?pdf=Hipotiroidismo>.
33. Biondi B, Wartofsky L. Treatment with thyroid hormone. *Endocr Rev.* 2014 J;35(3):433-512..
34. Association TAT. Hipertiroidismo U.S 2017 [citado el 17 de mayo 2017]. Disponible en:
<https://www.thyroid.org/wpcontent/uploads/patients/brochures/espanol/hipertiroidismo.pdf>.
35. Chistiakov DA. Thyroid-stimulating hormone receptor and its role in Graves' disease. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2003; 80(4):377-88.
36. Ferranti S. La tormenta perfecta: obesidad, disfunción del adiposito y consecuencias metabólicas. *Clin. Chem.* 2009; 34:95-108.
37. Shao SS, Zhao YF, Song YF, et al. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35(11):1411-20.
38. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(8):3088-91.
39. Rotondi M, Leporati P, La Manna A, et al. Raised serum TSH levels in patients with morbid obesity: is it enough to diagnose subclinical hypothyroidism? *Eur. J. Endocrinol.* 2009; 160(3):403-8.
40. Sanyal D, Raychaudhuri M. Hypothyroidism and obesity: An intriguing link. *Indian. J. Endocrinol. Metab.* 2016; 20(4): 554-557.
41. Fontenelle FM, Sever JS, Freitas TE, et al. Thyroid function in human obesity: Underlying mechanisms. *Horm. Metab. Res.* 2016; 48:787-94.
42. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012; 38(1):189-96.

43. Zeeni N, Dagher C, Dimassi H, et al. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm. Res.* 2015; 64(7):501-12.
44. Martire SI, Holmes N, Westbrook RF, et al. Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity. *PLoS. One.* 2013; 8(4):4-10.
45. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, et al. Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1997; 82(10):3331-6 .
46. Harun M, Asai M, Sun XY, et al. Effect of thyroid statuses on sodium/iodide symporter (NIS) gene expression in the extrathyroidal tissues in mice. *Thyroid. Res.* 2010; 3(1):1-3.
47. Alotaibi H, Tuzlakoglu M, Tazebay UH. The Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter: Molecular Characterization and Genomic Regulation. *Mol. Imaging. Radionucl. Ther.* 2016; 26(1):92-101.
48. Zhang HM, Zhou YQ, Dong Y, et al. Identification and functional characterization of a novel thyrotropin receptor mutation (V87L) in a Chinese woman with subclinical hypothyroidism. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(1):290-4.
49. Agretti P, De Marco G, Di Cosmo C, et al. Frequency and effect on serum TSH of phosphodiesterase 8B (PDE8B) gene polymorphisms in patients with sporadic nonautoimmune subclinical hypothyroidism. *J. Endocrinol. Invest.* 2014; 37(2):189-94.
50. Sánchez LM, Barquera S, Campos I, et al. Concentraciones séricas de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en niños, adolescentes y adultos mexicanos. México: INSP; 2012.
51. Gómez JH, Mendoza V, Ferreira A, et al. High Thyroid-stimulating Hormone Levels Increase Proinflammatory and Cardiovascular Markers in Patients with Extreme Obesity. *Arch. Med. Res.* 2016; 47(6):476-482.
52. Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals.* 2007; 41(1):111-119.
53. Tamay L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad.* 2013; 2(2):70-8.
54. Balzan S, Del Carratore R, Nicolini G, et al. Proangiogenic Effect of TSH in Human Microvascular Endothelial Cells through Its Membrane Receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97(5):1763-70.
55. Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, et al. Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(12):6139-45.
56. Antunes TT, Gagnon A, Langille ML, et al. Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-6 release from human adipocytes through activation of the nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology.* 2008; 149(6):3062-6.
57. Petry CJ, Ozanne CL, Wang CN, et al. Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clin. Sci.* 1997; 93(2):147-52.
58. Pesta DH, Samuel VT. A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. *Nutr. Metab.* 2014; 11(1):53.
59. Obregon MJ. Obesidad, termogénesis y hormonas tiroideas. *Rev. Esp. Obes.* 2007; 5:27-38.
60. Wojcik JL, Devassy JG, Wu Y, et al. Protein source in a high-protein diet modulates reductions in insulin resistance and hepatic steatosis in fa/fa Zucker rats. *Obesity (Silver Spring).* 2016; 24(1):123-31.

61. Lejeune MP, Westerterp TCM, Adam ND, et al. Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 83(1):89-94.
62. Hernando L AM, Aljama P. *Nefrología clínica*. Madrid: Médica Panamericana; 2014.
63. Kimura K, Morita M, Daimon M, et al. Utility of Cystatin C for Estimating Glomerular Filtration Rate in Patients With Muscular Dystrophy. *Int. Heart. J.* 2016 25; 57(3):386-8.
64. Díaz J FnM, Paredes F. *Aspectos básicos de bioquímica clínica*. Madrid: Díaz de Santos; 2000.
65. Benerji FM, Kumari R, Saha A. Comparative Study of ALT, AST, GGT & Uric Acid Levels in Liver Diseases. *IOSR-JDMS.* 2013; 7(5):72-5.
66. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, et al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine reviews.* 2003; 24(1):48-77.
67. Grandone A, Perrone L, Cirillo G, et al. Impact of phosphodiesterase 8B gene rs4704397 variation on thyroid homeostasis in childhood obesity. *Eur. J. Endocrinol.* 2012; 166(2):255-60.