



---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE LA INERVACIÓN PARASIMPÁTICA  
DEL PÁNCREAS Y TEJIDO ADIPOSO

*TESIS*

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**PRESENTA:**  
ELENA SIERRA PRIETO



CIUDAD..UNIVERSITARIA, CDMX

2018



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.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	<b>Profesor: Elena Zambrano González</b>
<b>VOCAL:</b>	<b>Profesor: Oscar Armando Pérez Méndez</b>
<b>SECRETARIO:</b>	<b>Profesor: Rudolf Marinus Buijs</b>
<b>1er. SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: José Vergara de la Fuente</b>
<b>2° SUPLENTE:</b>	<b>Profesor: María del Consuelo Plata Ramos</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE MECANISMOS E INTEGRACIÓN HIPOTALÁMICA  
B-215, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

**Dr. Rudolf Marinus Buijs**  
**(Asesor del tema)**

**M. en C. Rebeca Méndez Hernández**  
**(Supervisora técnica)**

**Elena Sierra Prieto**  
**Sustentante**

## Índice

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1 El Hipotálamo: Una estructura que controla las funciones básicas de nuestra fisiología.....	2
1.1.2 Los núcleos hipotalámicos poseen funciones fisiológicas definidas y se comunican entre sí para la regulación del organismo .....	3
1.1.3 El Núcleo Paraventricular: Control hormonal autónomo .....	5
1.2 El Núcleo Supraquiasmático o Reloj Biológico .....	6
1.2.1 El Núcleo Supraquiasmático recibe información de retroalimentación para sincronizar la fisiología de manera circadiana ...	8
1.3 El Sistema Nervioso Autónomo es una vía mediante la cual el Núcleo Supraquiasmático regula la fisiología.....	9
1.3.1 El Núcleo Motor Dorsal del Vago: Parte importante del Sistema Nervioso Parasimpático .....	11
1.4 Control hormonal y variaciones metabólicas .....	12
1.5 Hígado, Tejido adiposo y Páncreas .....	14
1.6 Desregulación y Obesidad .....	16
1.7 Trazado.....	19
1.7.1 Subunidad B de la toxina del cólera o CTB como trazador.....	20
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	21
2.1 Planteamiento del problema.....	21
2.2 Hipótesis .....	21
2.3 Objetivo general .....	21
2.3.1 Objetivo particular. ....	21
<b>3. EXPERIMENTAL</b> .....	22
3.1 Material y equipo .....	22
3.1.1 Uso y manejo de animales .....	22
3.1.2 Reactivos e Instrumentación .....	23
3.1.2.1 Reactivos.....	23

## *INDICE*

---

3.1.2.2 Instrumentación .....	24
<b>3.2 Procedimientos experimentales.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 Cirugías.....	24
3.2.2 Sacrificio, perfusión y obtención de cerebro y tallo .....	25
3.2.3 Inmunohistoquímica .....	27
<b>3.3 Análisis estadístico .....</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Experimentos en Zt 0 .....	30
4.2 Experimentos en Zt 6 .....	33
4.3 Experimentos en Zt 9 .....	34
4.4 Experimentos en Zt 12 .....	35
4.5 El trazado aumenta de la parte más caudal a rostral del Núcleo Dorso Motor del Vago y un lóbulo proyecta en mayor proporción al hígado y tejido adiposo .....	37
4.6 Gráficas de trazado y análisis estadístico. ....	40
4.6.1 Tejido Adiposo .....	40
4.6.2 Hígado.....	41
4.6.3 Correlación: Cantidad de trazado obtenido vs. Duración de cirugía .....	42
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>44</b>
5.1 El trazado obtenido no depende del tiempo .....	44
5.2 Siempre a considerar: la metodología.....	48
5.3 Las neuronas del Núcleo Motor Dorsal del Vago tienen una organización específica .....	49
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>52</b>

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<b>AP</b> .....Área Postrema	<b>NSQ</b> .....Núcleo Supraquiasmático
<b>ARC</b> .....Núcleo Arqueado	<b>NTS</b> .....Núcleo del Tracto Solitario
<b>AVP</b> .....Arginina Vasopresina	<b>PVN</b> .....Núcleo hipotalámico Paraventricular
<b>CC</b> .....Canal Central	<b>SN</b> .....Sistema nervioso
<b>CTB</b> .....Subunidad B de la Toxina del Cólera	<b>SNA</b> .....Sistema nervioso autónomo
<b>CVOs</b> .....Órganos circunventriculares	<b>SNC</b> .....Sistema nervioso central
<b>CY2</b> .....Cianina	<b>SNP</b> .....Sistema nervioso periférico
<b>CY3</b> .....Indocarbocianina	<b>SNPS</b> .....Sistema nervioso parasimpático
<b>DMV</b> .....Núcleo Motor Dorsal del Vago	<b>SNS</b> .....Sistema nervioso simpático
<b>GABA</b> .....Ácido $\gamma$ - aminobutírico	<b>TA</b> .....Tejido adiposo
<b>HDL</b> .....Lipoproteína de alta densidad	<b>TAB</b> .....Tejido adiposo blanco
<b>IMC</b> .....Índice de masa corporal	<b>TAM</b> .....Tejido adiposo pardo
<b>IML</b> .....Columna intermediolateral de la médula espinal	<b>VMH</b> .....Núcleo Ventromedial del Hipotálamo
<b>i.p.</b> .....Intraperitoneal	<b>Zt</b> .....Zeitgeber
<b>LDL</b> .....Lipoproteína de baja densidad	

## **RESUMEN**

Diariamente, en coordinación con los ciclos de luz-oscuridad del ambiente, todos los organismos sufren cambios fisiológicos y conductuales sincronizados, los cuales se presentan con regularidad de manera circadiana; todos éstos controlados por el reloj biológico, el Núcleo Supraquiasmático. Esto se regula en conjunto con la actividad del Sistema Nervioso Autónomo, predominando la actividad simpática en periodos de actividad y parasimpática en periodos de descanso. Se ha demostrado que órganos de importancia metabólica como el tejido y el hígado poseen inervación simpática, sin embargo, de la inervación parasimpática se duda de su existencia en estos órganos ya que diversos grupos no han encontrado evidencia de inervación de este tipo.

En este trabajo se estudió la hipótesis de que la presencia del trazador del tejido adiposo-DMV, páncreas-DMV e hígado-DMV depende de la hora del día en que éste sea inyectado en el respectivo tejido. El objetivo fue demostrar que existe inervación parasimpática del tejido adiposo retroperitoneal, páncreas y del hígado y analizar cómo se ve afectado el trazado de estos órganos a distintas horas del día.

En 28 animales se trazaron directamente los tejidos con CTB acoplado a un fluoróforo CY2 para hígado o CY3 para tejido adiposo a 4 tiempos distintos. Posteriormente se obtuvieron cortes de DMV para observar las neuronas parasimpáticas trazadas procedentes de estos tejidos. Se realizó un estudio cualitativo del trazado obtenido en cada tejido en cada tiempo. Al final, sí se observa trazado en DMV en distintas horas, en ambos tejidos y en diferente proporción. No se observaron diferencias significativas en el trazado entre los distintos tiempos estudiados, de igual forma, tampoco depende de la hora de día en que éste se realice. Con lo observado en este trabajo, las neuronas del DMV tienen una organización específica inervando de forma parasimpática en mayor o menor proporción determinados órganos, así como en algunos casos comparten determinadas neuronas. El trazado es una técnica sencilla y rápida que se puede ver afectada por diversos factores influyendo en los resultados obtenidos por lo que se debe ser muy cuidadoso al realizarla.

# 1. INTRODUCCIÓN

En todos los organismos, el Sistema Nervioso (SN) regula todas las funciones fisiológicas y conductuales y permite que éstos interactúen con su ambiente y se adapten a éste de diversas formas. Todas estas funciones se encuentran sincronizadas de manera rítmica de acuerdo con los ciclos luz-oscuridad principalmente, los que conocemos como ritmos circadianos.

## **1.1 El Hipotálamo: Una estructura que controla las funciones básicas de nuestra fisiología**

Los núcleos más antiguos y que se encargan de las funciones más primitivas dentro del SN son la médula espinal, el tronco encefálico y el cerebro medio, los cuales se encuentran conectados con el hipotálamo. En el hipotálamo, estas funciones, como el hambre, el comportamiento, los impulsos sexuales, la presión sanguínea, la temperatura, el sueño, entre otras, están organizadas y reguladas entre sí. Este trabajo enfatizará, principalmente, la información que el hipotálamo recibe del organismo y cómo la utiliza para la regulación de diversos procesos fisiológicos como los mencionados previamente. Esto se lleva a cabo, en gran parte, gracias a la regulación de la secreción de hormonas a través de su conexión con la hipófisis o glándula pituitaria<sup>1</sup> y de las conexiones con el Sistema Nervioso Autónomo (SNA).

La información que recibe el hipotálamo llega desde centros sensoriales especializados localizados en la médula espinal y en el tallo cerebral, así como de los órganos circunventriculares (CVOs) los cuales reciben información de la circulación; en conjunto, estos centros y los CVOs proveen información sobre el estado fisiológico del organismo, por ejemplo, temperatura, dolor, hambre, entre otras, para mantener la homeostasis corporal<sup>2</sup>.

Al recibir esta información, el hipotálamo es capaz de sincronizar toda la fisiología. Por ejemplo, uno de los núcleos hipotalámicos, el Núcleo Paraventricular (PVN), es importante para la regulación endócrina como en la secreción de arginina vasopresina en la neurohipófisis, la oxitocina y de las



## *INTRODUCCIÓN*

---

hormonas liberadoras en la eminencia media que llegan hasta la pituitaria como la hormona liberadora de tirotrópina. Además, el PVN prepara a los órganos diariamente para ser más susceptibles a estas hormonas mediante sus proyecciones autonómicas al Núcleo Motor Dorsal del Vago (DMV) y a la columna intermediolateral de la médula espinal (IML), las cuales dan origen a una inervación parasimpática o simpática respectivamente.

Todas las funciones del organismo cambian diariamente dependiendo de la hora del día. El hipotálamo es el principal regulador de todos los ritmos del organismo, los cuales surgen del reloj biológico maestro (de igual forma localizado en el hipotálamo) llamado Núcleo Supraquiasmático (NSQ). Esto lo hace a través de los núcleos hipotalámicos y la retroalimentación entre ellos y el NSQ.

De esta manera, el hipotálamo es importante para la regulación y sincronización endócrina, fisiológica y del comportamiento, incluyendo los ciclos de sueño-vigilia, de comida-ayuno, así como el metabolismo de la glucosa a lo largo del día, regulado por hormonas como el cortisol, en coordinación con el SNA<sup>3</sup> y los núcleos hipotalámicos.

### **1.1.2 Los núcleos hipotalámicos poseen funciones fisiológicas definidas y se comunican entre sí para la regulación del organismo**

El hipotálamo consiste en distintos núcleos conectados entre sí, los cuales poseen funciones definidas. En la tabla 1 se mencionan distintos núcleos hipotalámicos y su función.

## INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Ejemplos de núcleos hipotalámicos y su función principal

Núcleo Hipotalámico	Función
Área Preóptica Medial	Se asocia principalmente a la termorregulación y a la reproducción
Núcleo Paraventricular (PVN)	Tiene funciones principalmente endócrinas y autonómicas. Controlan la secreción de diversas hormonas.
Núcleo Ventromedial del Hipotálamo (VMH)	Participa en la regulación metabólica al recibir señales de saciedad del organismo para regular la ingesta y la homeostasis energética <sup>4</sup> .
Núcleo dorsomedial del hipotálamo	Se encarga de la integración hipotalámica.
Núcleo Arqueado (ARC)	Funciona como sensor metabólico del hipotálamo y participa en la regulación de la ingesta.

Todos estos núcleos se encuentran interconectados entre sí y reciben información del NSQ<sup>5</sup>, de la periferia y de las aferencias de otros núcleos hipotalámicos y del tallo cerebral por medio del Núcleo del Tracto Solitario (NTS)<sup>6</sup>. En la figura 1 se muestra la ubicación del hipotálamo y sus subnúcleos.

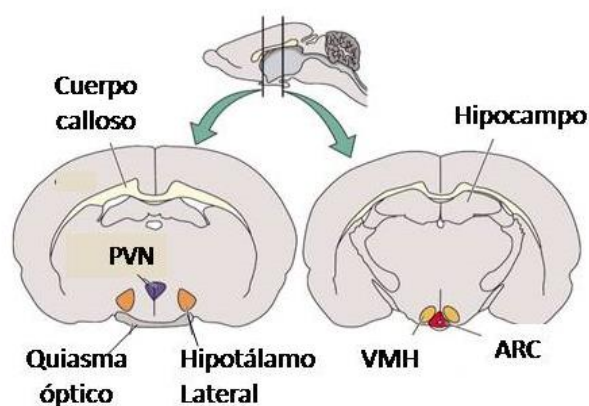


Fig 1. Ubicación del hipotálamo y del PVN en cerebro de rata y sus subnúcleos. Modificado de Rosenzweig, Breedlove & Watson (2010).

### 1.1. 3 El Núcleo Paraventricular: Control hormonal autónomo

El PVN es el centro hipotalámico para el control hormonal y autónomo. Controla la secreción de distintas hormonas según el subnúcleo que las libere. Por ejemplo, contiene las neuronas magnocelulares que proyectan a la pituitaria posterior, neuronas parvocelulares en la parte medial de este núcleo y neuronas posteriores (ver Figura 2)<sup>7,8</sup>.

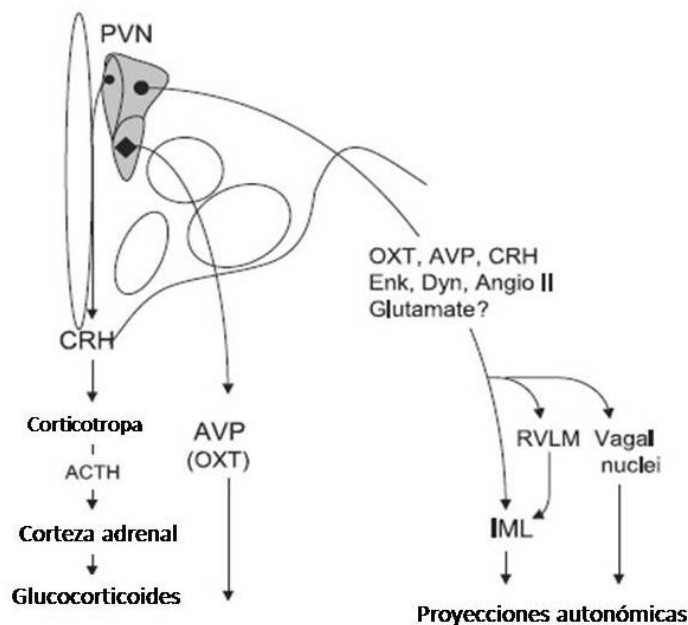


Fig. 2. Subdivisiones del PVN. Se observa que las neuronas parvocelulares de parte medial de este núcleo liberan hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula a la pituitaria anterior para liberar la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Las neuronas magnocelulares del PVN sintetizan Oxitocina (OXT) y Arginina Vasopresina (AVP) que se liberan hacia la hipófisis posterior. Además, una población de neuronas posteriores del PVN (neuronas preautonómicas) liberan AVP, OXT, CRH, angiotensina II (Angio II) y encefalina (Enk) proyectando a los núcleos autonómicos como el vago, la médula rostral ventrolateral (RVLM) y la IML<sup>7</sup>.

El PVN recibe también un aporte intrahipotalámico por el NSQ, haciéndolo una estructura clave en la regulación de los ciclos circadianos y de las funciones autonómicas<sup>7</sup>. El PVN posee neuronas preautonómicas que se comunican a los distintos núcleos hipotalámicos para controlar la actividad simpática y parasimpática en la periferia<sup>9</sup>.

### **1.2 El Núcleo Supraquiasmático o Reloj Biológico**

El reloj biológico principal o “maestro” es el NSQ. Después de que diversos estudios mostraron que muchos animales mostraban distintos ritmos sincronizados con la luz, en 1972 se realizaron lesiones en el NSQ, el cual es blanco de las fibras retinianas. Esto dio como resultado una desaparición total de los ritmos circadianos<sup>10</sup> y una desincronización conductual y fisiológica<sup>11</sup>. Así lo mostraron, Stephan y Zucker<sup>12</sup>, quienes vieron afectado el ciclo de ingesta de agua y actividad locomotora, al igual que los trabajos realizados por Moore y Eichler<sup>13</sup> que vieron afectado el ritmo de la corticosterona, con lo que se había encontrado un regulador del tiempo.

Diariamente, en coordinación con los ciclos de luz-oscuridad del ambiente, todos los organismos sufren cambios fisiológicos y conductuales sincronizados, los cuales se presentan con regularidad y son conocidos como ritmos o ciclos circadianos. Los ejemplos más claros de estos ciclos, por mencionar algunos, son el ciclo de sueño-vigilia, la conducta alimentaria o la liberación de determinadas hormonas a ciertas horas del día. Todos estos ciclos son regulados por el principal “reloj biológico”, el NSQ, a través de señales internas y estímulos del ambiente.

Como su nombre lo dice, el NSQ es un subnúcleo bilateral del hipotálamo que se encuentra justo encima del quiasma óptico (figura 3) y que se compone de aproximadamente 20,000 neuronas que presentan autonomía en su actividad eléctrica. Consta de 2 subdivisiones: una parte ventrolateral, la cual se encuentra en comunicación con la retina y una parte dorsomedial, la cual posee eferencias hacia otros núcleos hipotalámicos. Ambas poseen diversos tipos de neuronas capaces de liberar diversos neurotransmisores (glutamatérgicos, GABAérgicos, AVP, entre otros) y están comunicadas entre sí. El NSQ recibe 3 aferencias principales de estímulos fisiológicos y ambientales: de las células fotorreceptoras de la retina que proyectan directamente al NSQ, del núcleo intergeniculado que inerva el NSQ por la vía geniculohipotalámica y de las neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral; éstas se ven disparadas durante

## INTRODUCCIÓN

la vigila, y van disminuyendo su actividad durante el sueño hasta estar silentes en el sueño REM<sup>14, 15</sup>.

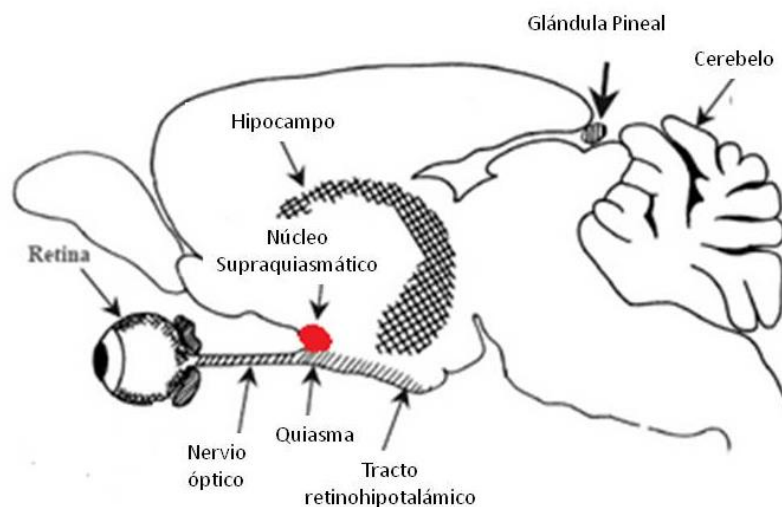


Fig. 3. Ubicación del “reloj biológico principal” o NSQ. Modificado de: Konturek, S.J, 2006.

El NSQ regula la fisiología del organismo al organizar los ritmos circadianos y sincronizar las funciones fisiológicas a través de diversas proyecciones eferentes<sup>16</sup> y hacia otros núcleos hipotalámicos (de la Iglesia y Schwartz en 2002)<sup>17</sup>.

Las neuronas del NSQ se sincronizan de manera circadiana al ciclo luz-oscuridad a través de los fotorreceptores circadianos los cuales detectan la cantidad de luz ambiental. Estos fotorreceptores circadianos son un tipo de célula ganglionar que proyectan al NSQ y poseen melanopsina, un fotorpigmento capaz de detectar la cantidad de luz que se recibe<sup>18</sup> a través del tracto retinohipotalámico. Dependiendo la hora del día, el NSQ puede modular su actividad simpática y parasimpática hacia cada órgano, a través de las proyecciones preautonómicas que posee en el hipotálamo. Además, el NSQ es capaz de reajustar este equilibrio autonómico dependiendo la condición fisiológica a la que se exponga un organismo por medio de circuitos de retroalimentación. Como se muestra en la figura 4, el NSQ es capaz de regular los ciclos circadianos endócrinos, fisiológicos y del comportamiento por medio de aferencias hacia la glándula pituitaria y al SNA.

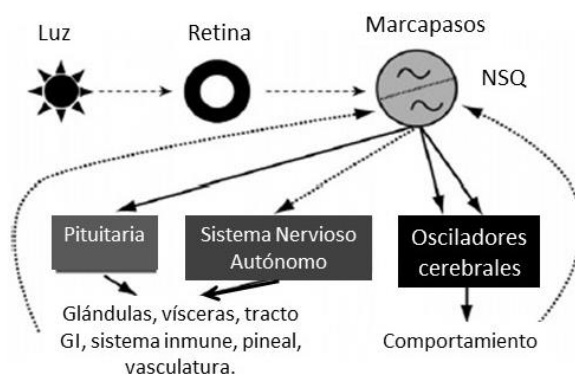


Fig. 4<sup>19</sup>. Estímulos que entran al NSQ a través del tracto retino-hipotalámico y las vías en que este regula los ciclos circadianos del comportamiento y los tejidos periféricos con la retroalimentación entre estos sistemas.

### 1.2.1 El Núcleo Supraquiasmático recibe información de retroalimentación para sincronizar la fisiología de manera circadiana

El NSQ, a su vez, mantiene la sincronía y dirige los ritmos de los tejidos periféricos a través de circuitos autonómicos, metabólicos y endócrinos, como es el caso de los glucocorticoides<sup>20</sup>. En el NSQ existen proyecciones hacia las neuronas preautonómicas del PVN para regular de forma circadiana la secreción de la hormona liberadora de corticotropina que se encarga de la liberación circadiana de corticosterona, disminuyendo ésta su concentración en el periodo de descanso y siendo mayor en el periodo de actividad. De igual forma, el PVN es sensible a sustancias que recibe de estas proyecciones, como, por ejemplo, la melatonina. De manera circadiana, el NSQ transmite señales a los circuitos descendientes (PVN) que hacen sinapsis en las neuronas simpáticas preganglionares de la IML, las cuales, entre otras funciones autonómicas, regulan la secreción de melatonina por medio de la glándula pineal<sup>21</sup>. Una característica del NSQ es que es rico en receptores a melatonina, lo que significa que ésta se une de manera específica al NSQ<sup>22</sup>, de modo que, al liberarse, puede funcionar como señal de retroalimentación en el NSQ. Durante el día, el NSQ inhibe la secreción de melatonina enviando mensajes inhibitorios a la glándula pineal. En la noche, el NSQ es menos

## INTRODUCCIÓN

activo, de tal forma que termina la inhibición ejercida en el día, se activa el PVN, produciendo melatonina por la glándula pineal.

Los ciclos circadianos se pueden ver afectados por el estilo de vida porque existen mecanismos de retroalimentación. Si las señales que recibe el NSQ del ambiente no están en sincronía con las señales internas, se promueve una desincronización interna y se genera un desbalance entre la actividad simpática y parasimpática. Este es el caso de los trabajadores nocturnos o de las personas con *jet-lag*, ya que los estímulos externos que recibe el organismo (como los producidos por la ingesta de comida en un horario inusual), promueven la liberación de distintas hormonas a “destiempo” y provocan mal estar mental y físico (ver figura 5)<sup>23</sup>. Estas señales contradictorias pueden derivar en patologías como la diabetes tipo 2, la obesidad o el síndrome metabólico<sup>24, 25</sup>.

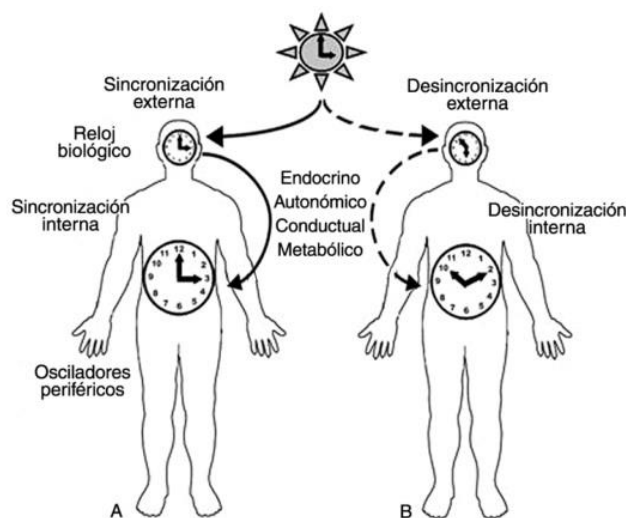


Fig. 5<sup>23</sup>. **A)** Individuo sano, sincronizado internamente y con su entorno. **B)** Individuo desincronizado con su ambiente; no hay relación entre los estímulos que recibe el NSQ ni de las señales que éste envía hacia la periferia.

### 1.3 El Sistema Nervioso Autónomo es una vía mediante la cual el Núcleo Supraquiasmático regula la fisiología

El NSQ puede modular la actividad simpática y parasimpática hacia cada órgano por medio de las proyecciones preautonómicas que posee en el hipotálamo. De este modo, provee de impulsos motores a todos los tejidos y músculos, así como a glándulas endócrinas y exócrinas.

## *INTRODUCCIÓN*

---

Para regular las necesidades fisiológicas y homeostáticas del organismo, el SNA funciona como un circuito de reflejos por medio de retroalimentación sensorial de órganos; estos reflejos son modulados por centros neurales localizados en el tronco encefálico, hipotálamo y la corteza prefrontal<sup>26</sup>.

El SNA comprende el Sistema Nervioso Simpático (SNS) y el Sistema Nervioso Parasimpático (SNPS). Un estudio realizado por el Dr. Buijs muestra que existe la separación de los sistemas simpático y parasimpático en el tallo cerebral e hipotálamo a nivel preautonómico, a pesar de que ambos son proyectados por el NSQ<sup>27</sup>. Ambos interactúan con el SNC a través de diversos núcleos como el NTS o el PVN. Mediante estas estructuras se transmite información de manera aferente y eferente, vía vago-vagal (comprendido por NTS como vía aferente y al DMV como vía eferente)<sup>28</sup>.

El SNS, de manera general, está encargado de responder a situaciones de estrés y peligro<sup>29</sup>; su principal neurotransmisor es la noradrenalina que estimula a los tejidos y a los órganos y tiene como respuesta dilatar las vías respiratorias, aumentar la presión arterial, aumentar la frecuencia cardíaca, la relajación de la vejiga, la contracción de los vasos sanguíneos, entre otras. Como se observa en la figura 6, el SNS deriva de las partes torácica, cervical y lumbar de la médula espinal.

La otra subdivisión, con actividad complementaria al SNS, encargada de la relajación y digestión, de disminuir la frecuencia cardíaca, de la dilatación de los vasos sanguíneos, de la contracción de pupilas, entre otras, es el SNPS, el cual, dado el tipo de respuestas, es antagónico al SNS<sup>30</sup>. En la figura 6 se observa que esta subdivisión nace del tronco cerebral y de la zona sacra de la médula espinal. Sus dos núcleos principales de salida se encuentran en el tronco encefálico, el núcleo ambiguo y el DMV e inervan a los órganos, liberando el neurotransmisor principal de este sistema, la acetilcolina.



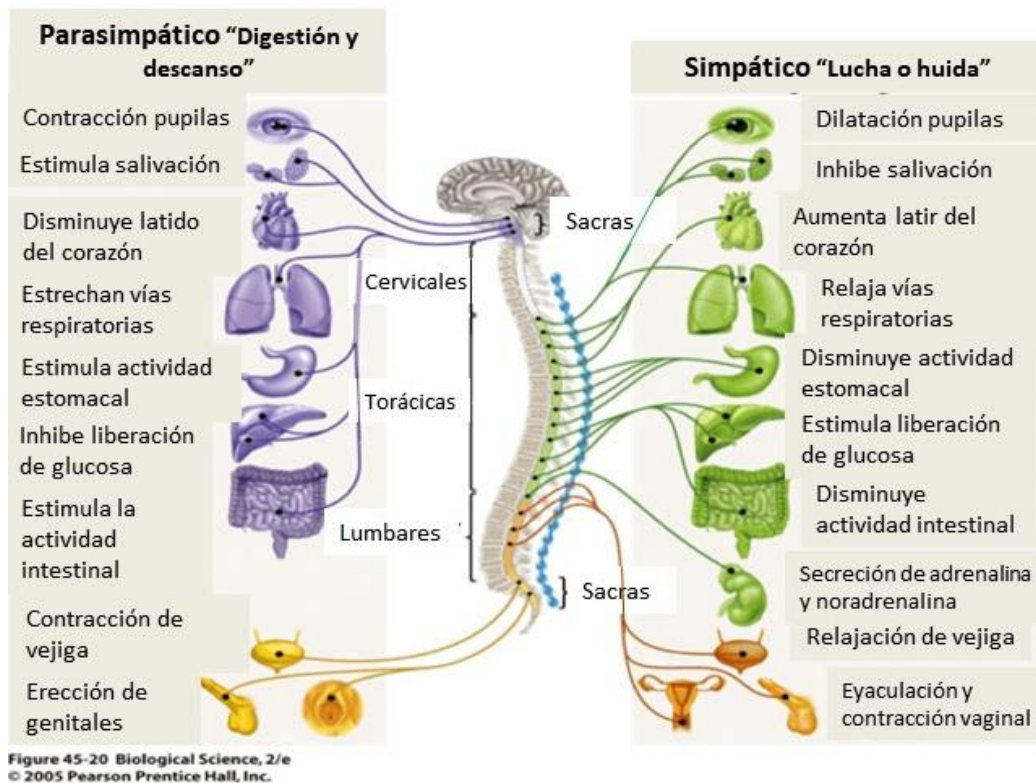


Fig. 6. Se muestran las respuestas antagónicas entre el SNPS (izquierda) y del SNS (derecho), así como las zonas de donde nacen estos sistemas. (Obtenido de Biological Science, 2005 Pearson Prentice Hall, Inc).

### 1.3.1 El Núcleo Motor Dorsal del Vago: Parte importante del Sistema Nervioso Parasimpático

El DMV es un núcleo bilateral simétrico que posee neuronas motoras preganglionares parasimpáticas, las cuales inervan las vísceras del tórax y del abdomen a través del nervio vago<sup>31</sup>, por lo que es considerado como la fuente principal de inervación parasimpática de varios órganos del tracto gastrointestinal incluyendo el estómago, hígado y el páncreas.

Se localiza en la parte caudal dorsomedial de la medula oblongata cerca del cuarto ventrículo. En la medula oblongata rostral, ambos lados del DMV se encuentran ventromediales al NTS mientras se va abriendo el cuarto ventrículo<sup>32, 33</sup>.

Así como el DMV posee diversas proyecciones, éste recibe distintas proyecciones del SNC, como el PVN, el NTS y el Núcleo Hipotalámico

## INTRODUCCIÓN

---

Dorsomedial. En el DMV existen neuronas capaces de sintetizar diversos neurotransmisores de función parasimpática, acetilcolina principalmente, sin embargo, diversos estudios han demostrado que el glutamato (excitador) y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (inhibitorio) tienen mayor impacto en la inervación proveniente del DMV en el caso del páncreas y del estómago<sup>33</sup>; en este último, por la rama gástrica y hepática<sup>34</sup>, así como en las interneuronas. La información de sensores vagales de la periferia llega al NTS y se distribuyen en el SNC, principalmente en el hipotálamo. Ésta puede integrarse con más información del organismo como lo son los ciclos circadianos<sup>35</sup>.

Por otro lado, el DMV tiene importancia en la regulación de la glucosa, ya que recibe información de las neuronas glucosensitivas del NTS, las cuales detectan los cambios de ésta a través de las aferentes vagales, y en respuesta, modula la inervación vagal al páncreas<sup>36</sup> para modificar la secreción de insulina y glucagón.

### **1.4 Control hormonal y variaciones metabólicas**

Las concentraciones de diversos nutrientes y metabolitos varían a lo largo del día. Un ejemplo, es el hecho que la concentración de glucosa en plasma varía a lo largo del día: en el periodo de descanso nuestra demanda energética es menor y las concentraciones de glucosa son bajas. La homeostasis de la glucosa es regulada por la producción hepática de glucosa y su utilización de los órganos periféricos incluyendo el hígado, el tejido adiposo pardo (TAM) y el tejido adiposo blanco (TAB).

Se ha observado que el NSQ regula los cambios diurnos en la producción de leptina por el tejido adiposo (TA)<sup>37</sup>, las concentraciones de glucosa en el plasma a lo largo del día y las respuestas del páncreas y el hígado ante cambios bruscos de glucosa en sangre después de la ingesta de alimentos o en hipoglicemia<sup>38</sup>.

De igual forma, los órganos son afectados por el sistema endócrino. Por mencionar un ejemplo, la leptina es una hormona que estimula la sensación de

## INTRODUCCIÓN

saciedad e inhibe el hambre. Es liberada principalmente por el TA y su concentración es mayor al inicio del periodo de actividad (noche en ratas)<sup>39</sup>.

El SNA tiene influencia en el metabolismo. La actividad del SNPS está asociada a la captación de glucosa por el hígado y el tejido adiposo y con la liberación de insulina por el páncreas. Por otro lado, el SNS incrementa la glucosa justo al inicio del periodo de actividad<sup>40</sup>. El hipotálamo sensa estas variaciones por medio de circuitos de retroalimentación con sus diversos núcleos. El ARC participa en la homeostasis de la glucosa enviando proyecciones a diversos núcleos del hipotálamo como el VMH y el DMV para supervisar las concentraciones de insulina, glucosa y leptina en el organismo<sup>46</sup>. En la figura 7 se ilustra la regulación de la homeostasis de la glucosa.

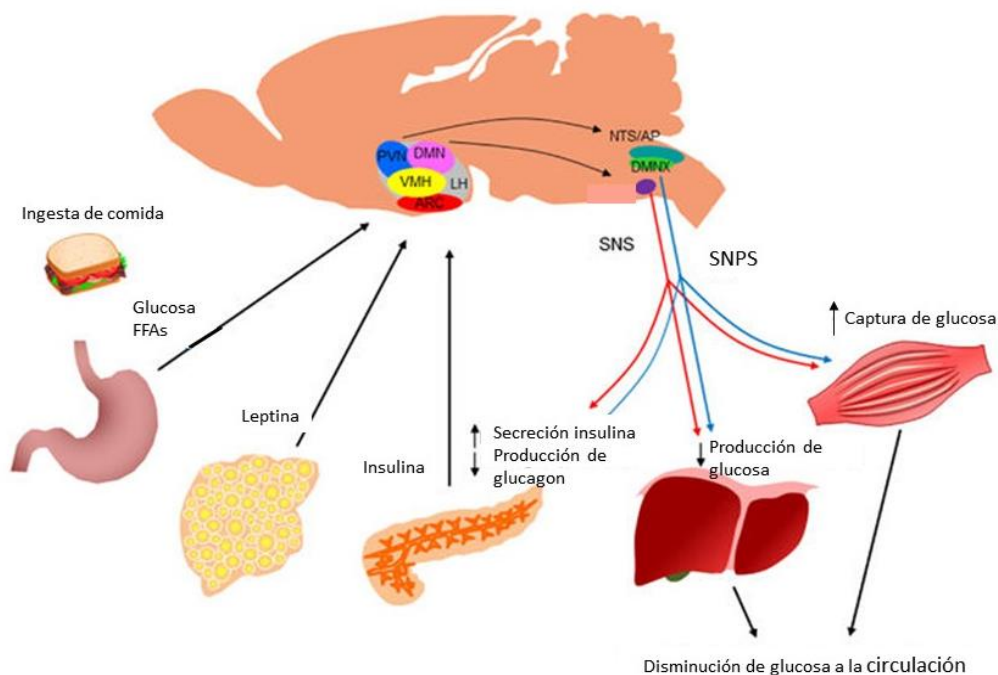


Fig. 7. Se muestra la regulación de la homeostasis de la glucosa. El SNC recibe señales metabólicas en los diversos núcleos hipotalámicos a través de hormonas como la leptina e insulina y de nutrientes como ácidos grasos y glucosa que son detectados por CVOs, ARC o aferentes vagales y espinales. Además, modula al SNA, el cual inerva órganos periféricos para regular la liberación de insulina y el glucagón a través del páncreas, así como la producción de glucosa en el hígado y la recaptura de glucosa por el músculo. FFAs, Ácidos grasos libres; PVN, Núcleo Paraventricular; DMN, Núcleo Dorsomedial; VMH, Núcleo Ventromedial; LH, Hipotálamo Lateral; ARC, Núcleo Arqueado, NTS, Núcleo del Tracto Solitario; AP, Área Postrema; DMNX, Núcleo Motor Dorsal del Vago; SNS, Sistema Nervioso Simpático; SNPS, Sistema Nervioso Parasimpático. Obtenido de<sup>41</sup>

### 1.5 Hígado, Tejido adiposo y Páncreas

El hígado es principal almacén de glucosa, es capaz de capturarla glucosa circulante, así como de secretar glucosa a la circulación. También responde a la insulina por medio de señales metabólicas, como lo son nutrientes y hormonas liberadas, que además son sensadas por los diferentes núcleos hipotalámicos, principalmente el ARC y el tallo cerebral (AP, NTS y DMV) <sup>40</sup>.

El hígado responde a la insulina secretada, absorbiendo la glucosa en sangre y sintetizando glucógeno; o cuando no se ingiere alimento y los niveles de glucosa en sangre son bajos, el hígado realiza la glucogenólisis y la gluconeogénesis para proveer al organismo de glucosa.

El páncreas es otro órgano que regula los niveles de glucosa. Éste lo hace a partir de la secreción de insulina a partir de las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en respuesta a la elevación de glucosa en sangre. La insulina secretada estimula la captura de glucosa y de ácidos grasos en el tejido adiposo e inhibe la actividad de la lipasa sensible a hormonas, disminuyendo la lipólisis. Asimismo, promueve la captación de glucosa en el músculo y estimula la síntesis de glucógeno y bloquea la glucólisis y la gluconeogénesis en el hígado. Las células  $\alpha$  del páncreas secretan glucagon el cual estimula la producción de glucosa por el hígado (glucogenólisis y gluconeogénesis).

Tanto el hígado como el páncreas son inervados de manera simpática por los nervios espláncnicos y de manera parasimpática por los nervios vagales que provienen del complejo dorsal vagal (conformado por el DMV, NTS, AP y Núcleo Ambiguo)<sup>42</sup>.

El TA tiene la capacidad de almacenar grandes cantidades de triglicéridos. Dentro de las funciones principales de éste se encuentran la de reserva de energía o de protección.

El TA se divide principalmente en 2 tipos:

1. **Tejido adiposo pardo o multilocular:** este tipo de grasa tiene una coloración parda a rosada debido a la elevada presencia de mitocondrias y su contenido en ellas de citocromos. Recibe inervación

simpática y sus adipocitos están conformados por varias gotas de grasa. Posee la proteína desacoplante UCP1 la cual desacopla la cadena de transporte de electrones inhibiendo la síntesis de ATP, por lo que éste tejido adiposo se utiliza para producir calor y contribuye a la termorregulación<sup>43</sup>.

2. **Tejido adiposo blanco o unilocular:** como su nombre lo indica, esta grasa es de color blanco y llega a alcanzar hasta tonos amarillentos. Está formado por una sola gota grande de grasa que ocupa todo el citoplasma del adipocito. Recibe innervación simpática y parasimpática y tiene funciones endócrinas, ya que es capaz de secretar hormonas como la leptina y adiponectina. Estas hormonas funcionan como señales de retroalimentación en el hipotálamo para modular la ingesta de alimentos y modular el tono autonómico para mantener su balance con funciones endócrinas y exócrinas. También funciona como reservorio de energía química, modela la superficie corporal y da protección<sup>43</sup>.

El tejido adiposo, desde el punto de vista anatómico, se distribuye en diversos compartimientos, (figura 8). Para fines de este trabajo, se hará énfasis en el tejido adiposo intrabdominal, específicamente en el retroperitoneal.

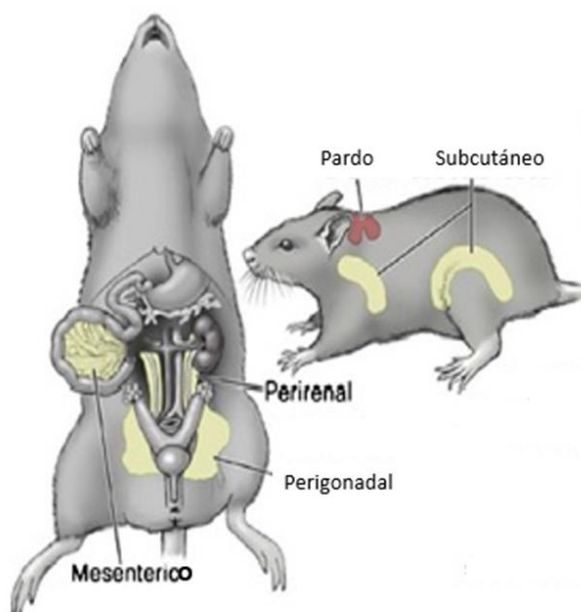


Fig. 8. Ejemplos de distintos tipos de depósitos de WAT en ratas. Modificado de <sup>44</sup>.

## INTRODUCCIÓN

El TA extraperitoneal comprende el TA intrabdominal, el cual se encuentra dentro de las paredes musculares del abdomen y el TA retroperitoneal, el cual se utiliza en este trabajo. El TA retroperitoneal se encuentra entre el peritoneo y la parte más profunda de los músculos del abdomen e incluye la grasa perirrenal<sup>41, 43</sup>.

### 1.6 Desregulación y Obesidad

En 1988, Peterson demostró que a mayor noradrenalina en sangre existe menor índice de grasa corporal, y evidenció una relación directa entre la frecuencia cardíaca y la grasa corporal<sup>45</sup>, sugiriendo que esto depende de una mayor o menor actividad simpática. Otro factor relacionado con la obesidad es el balance entre la actividad del TAB y del TAM, ya que mientras el TAB está asociado a la ganancia de peso, el TAM contribuye al gasto energético (como se observa en la figura 9). También el compartimiento de TA donde se almacene la grasa parece tener importancia en algunas patologías, ya que, si se almacena subcutáneamente en los pacientes, el riesgo de padecer diabetes tipo 2 o síndrome metabólico es menor que si se almacena de manera visceral<sup>46</sup>. La Organización Mundial de la Salud define el sobrepeso y la obesidad como “una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud”, basado en el índice de masa corporal (IMC) (sobrepeso  $IMC \geq 25$ ; obesidad  $IMC \geq 30$ )<sup>47</sup>.

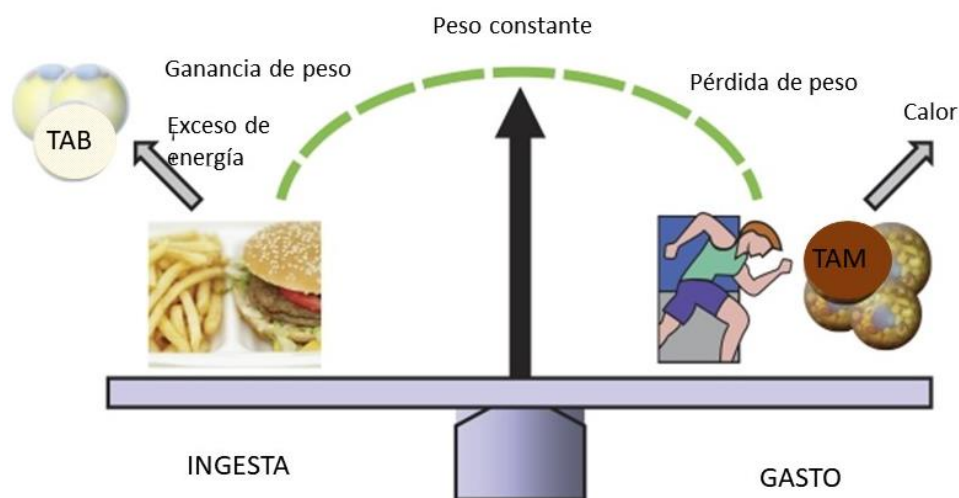


Fig. 9. Balance entre WAT y BAT. Mientras el WAT contribuye a la ganancia de peso al existir un exceso en la ingesta calórica, mientras, el BAT se encarga del gasto energético disipándolo en forma de calor.

Obtenido de<sup>48</sup>.

## *INTRODUCCIÓN*

---

Actualmente muchos factores son conocidos como desencadenantes de la obesidad, como un desequilibrio entre la ingesta calórica y el gasto energético, una vida sedentaria. Se ha demostrado, incluso que, entre ellos, están afectaciones en la actividad del SNA. Se cree, que al padecer esta enfermedad existe un desequilibrio autonómico, disminuye la actividad simpática hacia los órganos viscerales (catabólica), provocando una disminución en la lipólisis, aumenta la actividad parasimpática (anabólica) aumentando la lipogénesis provocando una ganancia de peso.

El hígado tiene aferencias y eferencias, que regulan la sensación de saciedad y controlan el metabolismo de glucosa y ácidos grasos por medio de la inervación vagal principalmente por la vena porta, a través de una retroalimentación negativa<sup>49</sup>. Al existir una desregulación metabólica al padecer obesidad, hay una inflamación crónica asociada, resistencia a la insulina y a diabetes mellitus tipo 2<sup>50</sup>.

En diversos estudios se ha mostrado que el tamaño del compartimiento adiposo intrabdominal se asocia con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y metabólica como es el caso del síndrome metabólico. Este último se caracteriza por hipertensión arterial, hiperinsulinemia (pudiendo desarrollar diabetes tipo 2), aumento de lipoproteína de baja densidad (LDL) y disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL), las que conocemos como dislipidemias, así como un exceso en la grasa intrabdominal. Tanto las aferencias como las eferencias del nervio vago se encargan de la homeostasis metabólica y de la regulación del balance energético; las aferencias son las encargadas de sensar los niveles de nutrientes y metabolitos como lo son los lípidos, colecistoquinina, péptido Y, leptina, insulina y glucosa. Se cree que una disfunción autonómica y la disminución de la actividad del nervio vago son frecuentes en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y obesidad; esto se observó en un estudio de seguimiento el cual reveló relación entre la disfunción autonómica y una actividad insuficiente del nervio vago (estudio realizado en la recuperación de frecuencia cardíaca), la homeostasis de la glucosa alterada y el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2<sup>51</sup>. También se ha demostrado, que las

## *INTRODUCCIÓN*

---

ratas y humanos que padecen obesidad tienen mayor cantidad de leptina, sin embargo, poseen resistencia a ésta en las aferencias vagales<sup>52</sup>.

Por muchos años, se creyó que el tejido adiposo únicamente recibía innervación simpática; sin embargo, debido a los alarmantes datos epidemiológicos de asociación entre el almacenamiento de grasa intra-abdominal y de morbilidad, además del hecho de que la distribución adiposa no es “uniforme” en todas las partes del cuerpo, llevaron a un estudio realizado por Kreier en 2002, que demostró que el tejido adiposo también recibe innervación vagal. En este estudio mostraron que la activación del SNPS ejerce un efecto anabólico sobre el TA, en contraste con el efecto catabólico previamente demostrado del SNS. La denervación parasimpática del TA resultó en una disminución en la liberación de la leptina y resistina, así como en una disminución en la captura de glucosa y ácidos grasos junto con un aumento de la actividad de la enzima lipasa sensible a hormonas (HSL), en este tejido. Estos datos muestran el impacto que el SNPS tiene en el crecimiento de la grasa intrabdominal y de su importancia en la captura de glucosa y ácidos grasos, lo que sugiere una influencia de éste en la obesidad<sup>53</sup>. En estudios de trazado con el virus de la pseudorrabia (trazador retrógrado, multisináptico formado por un virus neurotrópico envuelto y capaz de infectar las células nerviosas al llegar al soma y circuitos neuronales<sup>54</sup>), se encontró la presencia del virus en neuronas del DMV y del núcleo ambiguo (ambos del SNPS) después de realizar la infección de éste en el TAB, sugiriendo que el TA recibe innervación parasimpática<sup>55</sup>.

Otro estudio que cabe mencionar es el realizado por Kreier en 2006, donde observaron que diversas neuronas del DMV se proyectan al hígado, páncreas y al TA, y algunas de ellas colocalizan<sup>56</sup> por medio de técnicas de trazado. Este estudio mencionado, utiliza la misma técnica que este trabajo, demostrando que existe innervación vagal hacia el compartimiento abdominal.



### 1.7 Trazado

El trazado es una técnica que puede utilizarse para estudiar la anatomía del sistema nervioso. En ésta se inyecta una sustancia, llamada trazador, en la región que se pretende estudiar, y dicha sustancia es incorporada a las neuronas y transportada a lo largo de sus prolongaciones por transporte activo. Se basa en la capacidad que tienen las neuronas para incluir sustancias y transportarlas a otras partes de la neurona<sup>57</sup>.

Existen tres tipos de trazado:

1. Anterógrado (que va del soma a las terminales axónicas).
2. Retrógrado (el cual va desde las terminales al soma) como se muestra en la figura 10.
3. En ambos sentidos. Puede ser aplicado en un órgano periférico, en un ganglio o en alguna zona cerebral.

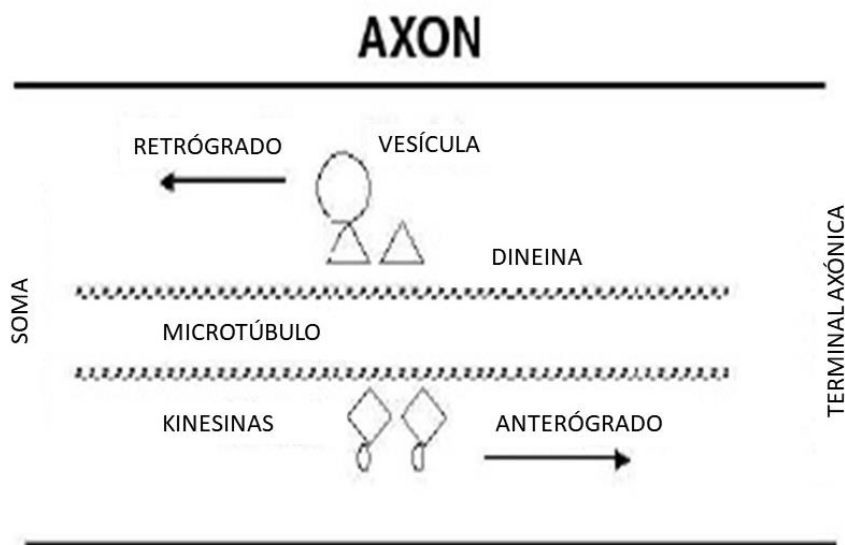


Fig. 10<sup>58</sup>. Ilustración de trazado retrógrado (aplicado en este trabajo) por medio del transporte vesicular a través de dineínas y anterógrado, a través del microtúbulo por medio de kinesinas.

El uso de esta técnica ha permitido determinar las proyecciones de algunas rutas y vías neuroanatómicas. El uso de trazadores retrógrados es más común debido a su fácil manejo y baja toxicidad<sup>59</sup>. Por ejemplo, gracias a esta técnica se ha logrado demostrar que existe una separación total en el cerebro de las neuronas que proyectan hacia el SNS y el SNPS desde el NSQ<sup>29</sup>.

### 1.7.1 Subunidad B de la toxina del cólera o CTB como trazador

La subunidad B de la toxina del cólera (CTB) es una toxina tipo lectina secretada por la bacteria *Vibrio Cholerae*, la cual tiene la capacidad de unirse a los receptores gangliósidos de la membrana glicolípida de la superficie celular<sup>60</sup> y se utiliza en esta técnica como trazador ya sea anterógrado o retrógrado<sup>61</sup>, además de poseer ventajas como que no sufre daños con el paraformaldehído usado en la perfusión, resulta ser muy sensible al momento de observar, así como en estudios *in vivo*, es monosináptico y se puede combinar con técnicas de inmunohistoquímica e histoquímica<sup>62</sup>.

El CTB utilizado estaba acoplado a alguno de 2 fluoróforos, cianina (CY2) o indocarbocianina(CY3). Esto presenta la ventaja que se puede hacer una inyección en 2 tejidos diferentes y observar el trazador en el cerebro diferenciando qué neuronas proyectan a cada tejido.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1 Planteamiento del problema**

Todas las funciones del organismo, incluyendo las funciones metabólicas, se encuentran reguladas y sincronizadas por los ciclos de luz y oscuridad. Esto se regula a través de la actividad del SNA, predominando la actividad simpática en periodos de actividad y parasimpática en periodos de descanso.

Se puede considerar como los órganos más representativos de las funciones metabólicas al TA y el hígado. Se ha demostrado que ambos poseen inervación simpática, sin embargo, la inervación parasimpática resulta aún muy polémica. Diversos grupos de investigación han realizado estudios al respecto utilizando la técnica del trazado, sin haber encontrado evidencia de inervación parasimpática, ya que, así como unos han encontrado presencia del trazador en el DMV<sup>53, 56</sup>, otros no han encontrado presencia del neurotransmisor clásico parasimpático, la acetilcolina, ni trazado significativo poniendo en duda la inervación parasimpática que recibe tanto el TA como el hígado<sup>55, 67</sup>.

Por lo anterior, es de interés estudiar la inervación parasimpática del TA y el hígado utilizando la técnica del trazado, así como los factores que pueden influir en el trazado de estos órganos, principalmente la hora del día, ya que se cree que la actividad de las neuronas del DMV podría depender de este factor.

### **2.2 Hipótesis**

El trazado del TA-DMV, páncreas-DMV e hígado-DMV depende de la hora del día en que éste sea inyectado en el respectivo tejido.

### **2.3 Objetivo**

Analizar cómo se ve afectado el trazado del TA retroperitoneal, páncreas e hígado a distintas horas del día.

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1 Material y equipo

#### 3.1.1 Uso y manejo de animales

Se utilizaron 28 ratas Wistar machos de 8 semanas 200-250g criadas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Se guardaron a una temperatura de 22°C y se colocaron 4 ratas por caja, con agua y alimento *ad libitum* y se dejó que se adaptaran una semana al ciclo de luz-oscuridad, siendo 8:35 hora que se encendía la luz (Zt0) y 20:35pm hora de inicio de oscuridad (Zt12).

Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones, técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

1. A 4 ratas se les inyectó el trazador en TA y páncreas en Zt 0 (8:30am).
2. A 4 ratas se les inyectó el trazador en TA y páncreas en Zt 12 (20:30pm).
3. A 6 ratas se les inyectó el trazador en TA e hígado en Zt 0.
4. 4 ratas a las que se les inyectó el trazador en tejido adiposo e hígado en Zt12.
5. A 5 ratas se les inyectó el trazador en TA e hígado en Zt 6 (13:00pm)
6. 5 ratas a las que se les inyectó el trazador en TA e hígado en Zt 9 (17:30pm).

Lo anterior se ilustra en la figura 11.

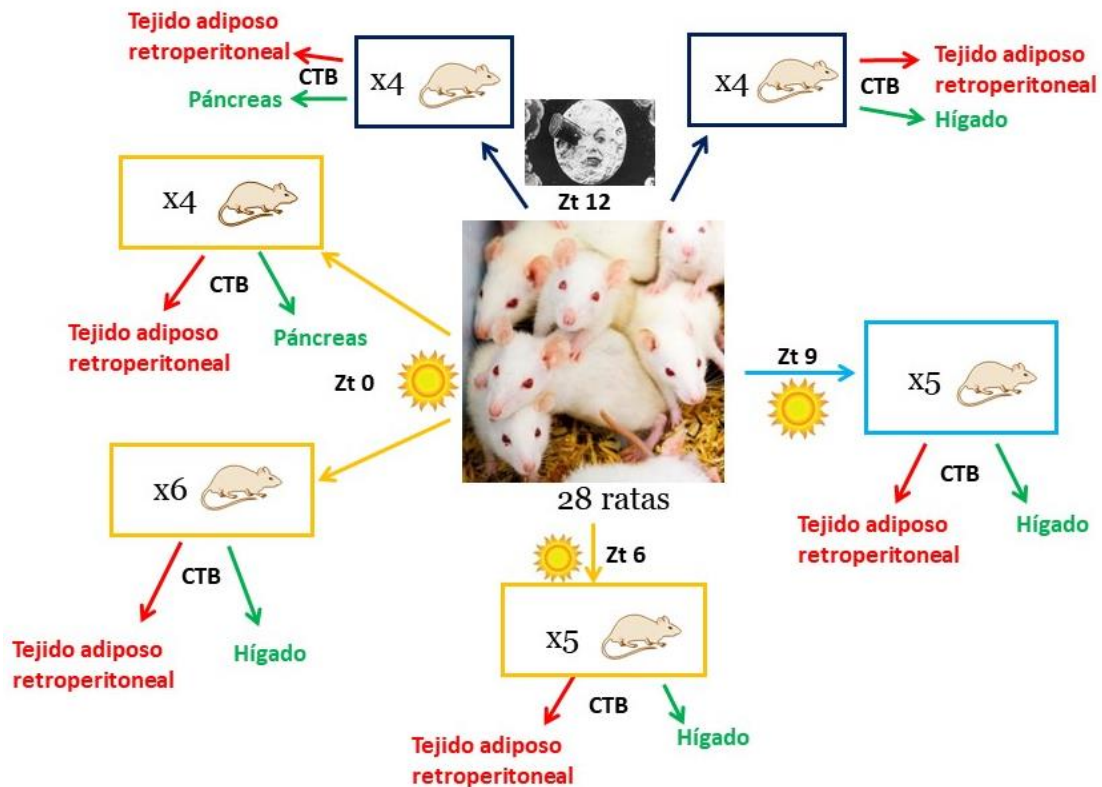


Fig. 11. Esquema de los animales utilizados con sus respectivas cirugías

### 3.1.2 Reactivos e Instrumentación

#### 3.1.2.1 Reactivos

-Anestésicos: PROCIN® (Xilazina PiSA, solución inyectable), ANESKET® (Ketamina PiSA solución inyectable 1000mg/10ml) y PISABENTAL® (Pentobarbital sódico solución inyectable).

-Solución de paraformaldehído al 4% en PBS. pH 7.4

-Solución de PBS pH 7.4

-Solución de sacarosa en agua al 30%.

Solución salina (NaCl) al 0.9% en agua.

-Trazador CTB (invitrogen™) 0.25% en PBS. Fracción B de la toxina del cólera conjugado con CY3 (570 nm) para el tejido adiposo (rojo) y CTB (invitrogen™) acoplado a CY2 (510nm) para el páncreas e hígado (verde).

-Movviol

### **3.1.2.2 Instrumentación**

-La obtención de cortes del DMV para la inmunohistoquímica se realizó con ayuda de un criostato (LUPETEC, CM 2850 Cryostat Microtome).

-Se observaron los tejidos trazados con el microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

-Las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad Prism 6.

## **3.2 Procedimientos experimentales**

### **3.2.1 Cirugías**

#### **-Inyección del trazador CTB**

Esta cirugía tiene como objetivo principal introducir el trazador directamente al páncreas, hígado o tejido adiposo a cuatro tiempos determinados:

- a) 8:35 am (Zt0) hora en que se enciende la luz del bioterio
- b) 13:00pm (Zt 6).
- c) 17:35pm (Zt 9).
- d) 20:35pm (Zt 12) hora en que se apaga la luz del bioterio.

Se anestesió a la rata vía i.p con xilacina (0.1mg/kg) y posteriormente ketamina (80mg/kg). Se rasuró a la rata del abdomen, debajo de la costilla y de la línea media hacia el costado izquierdo de la rata, aproximadamente 4cm hacia abajo. Se hizo una incisión con el bisturí en dirección vertical justo debajo de las costillas. Se cortaron ambas capas musculares y se desgarró con las tijeras en dirección a la incisión. Se procedió a ubicar el tejido adiposo retroperitoneal o el páncreas, según sea el caso:

## EXPERIMENTAL

---

- **Páncreas:** Expuesto el peritoneo, se ubicó el páncreas. Una vez localizado se sacó una parte y se inyectaron directamente 3µl de CTB-CY2 con una microjeringa (Hamilton).
- **Hígado:** Expuesto el peritoneo, se localizó el hígado. Una vez localizado se sacó una parte y se inyectaron directamente en el hígado, justo a un costado de la vena porta, 3µl de CTB-CY2 con una microjeringa (Hamilton).
- **Tejido adiposo retroperitoneal:** Se procedió a ubicar el tejido adiposo retroperitoneal de acuerdo con la Fig.11. Una vez localizado, se inyectaron directamente al tejido 3µl de CTB-CY3 con una microjeringa (Hamilton).

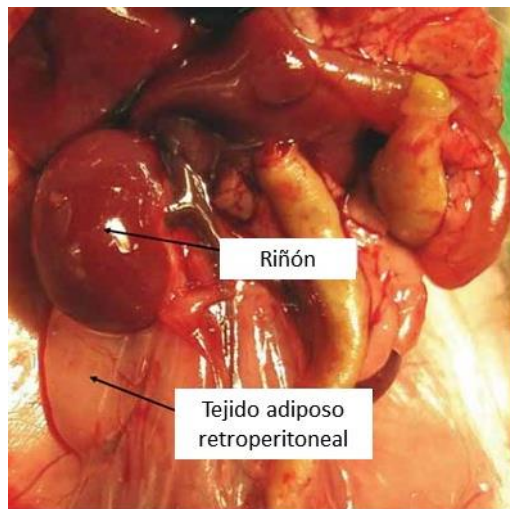


Fig. 12. Ubicación del tejido adiposo retroperitoneal en rata. (Obtenido de WikiPreMed MCAT Course).

Para finalizar, en ambos casos, se suturaron ambas capas musculares y posteriormente se suturó la piel de manera subcutánea con un solo hilo en zigzag.

### 3.2.2 Sacrificio, perfusión y obtención de cerebro y tallo

Estos procesos están basados en el método descrito por Gage, 2012<sup>63</sup>. Para todos los animales utilizados, el sacrificio se realizó 7 días después de la inyección del trazador.

Primeramente, cada rata se anestesió con una sobredosis de pentobarbital sódico (aprox. 2.4ml/kg). Posteriormente se abrió la caja torácica a la altura de

## EXPERIMENTAL

las costillas hasta que se localizó el esternón. Una vez localizado, se rompieron las costillas para dejar al descubierto el corazón. Hecho esto, se sujetó y se insertó la jeringa justo en la punta del ventrículo derecho del corazón hasta llegar a la vena. Se fijó la aguja en su lugar con una pinza hemostática. Inmediatamente que se inició el flujo de solución salina, se cortó la aurícula derecha. En primer lugar, se perfundieron 200ml de la solución salina al 0.9% para limpiar los tejidos. Esto hasta que se torne la sangre casi incolora y líquida y las orejas y patas del animal quedaran incoloras. Luego se procedió a perfundir con una solución de paraformaldehído al 4% hasta que se fijaron y endurecieron los tejidos.

Se decapitó a la rata y se extrajo el cerebro, cerebelo y tallo cerebral retirando meninges y cortando el quiasma óptico. Posteriormente se separaron el cerebro y tallo cerebral y se dejaron incubar 24hrs en una solución de paraformaldehído 4%. Pasado esto se transfirieron a una solución de sacarosa al 30% por 24hrs.



Fig.13. Cerebro, cerebelo y tallo cerebral, obtenido de rata Wistar macho.



### **3.2.3 Inmunohistoquímica**

Se obtuvieron cortes coronales de 30µm del tallo cerebral a la altura del DMV de la parte más caudal a rostral (-14.64 a -13.44mm respecto a Bregma) de todas las ratas utilizadas con ayuda de un criostato LUPETEC a -20°C.

Se seleccionaron de tres a cuatro cortes de cada parte del DMV (estas son reconocidas por como lo ilustra Paxinos y Watson, 2009<sup>64</sup>) por tallo obtenido y se montaron en un portaobjetos. Se dejaron secar 24hrs y después se lavaron con agua destilada para ser cubiertos en medio de montar con un cubreobjetos. Se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal. Para observar la presencia del trazador fluorescente.

### **3.3 Análisis estadístico**

Para analizar los datos obtenidos se realizó la prueba estadística Kruskal-Wallis con el software GraphPad Prism 6. Un valor de  $P < 0.05$  se consideró significativo. Se presentan las gráficas de los tejidos con sus respectivas medianas.

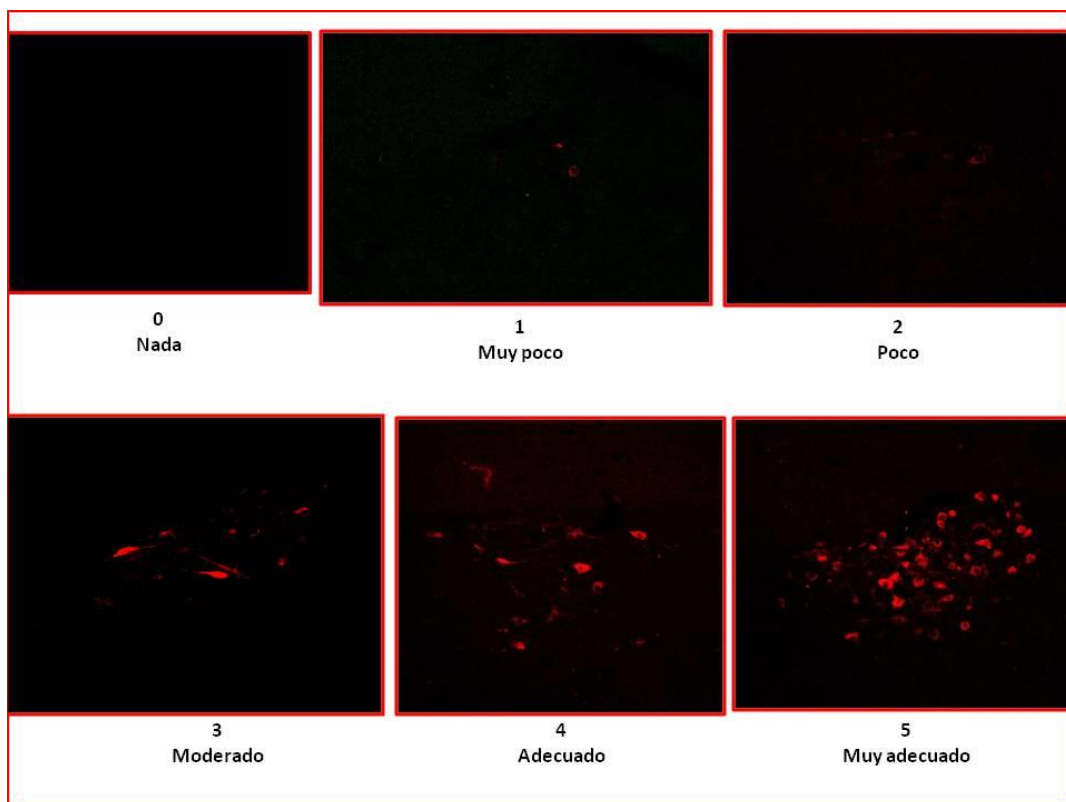
## 4. RESULTADOS

Los resultados se presentarán por la hora del día en que fueron operadas las ratas y en el hecho de que presentaron o no trazado y en qué tejido.

Se trazó el tejido adiposo con CTB acoplado a CY3 como fluoróforo (rojo) y se trazó hígado o páncreas con CTB acoplado a CY2 (verde) en 4 tiempos Zt 0, 6, 9 y 12. De cada rata se obtuvieron partes representativas de cada sección del DMV, de la parte más caudal a rostral. Posteriormente se observó en un microscopio confocal para fluorescencia, las imágenes se tomaron en el objetivo de 20x y 40x del microscopio LSM Pascal 5.

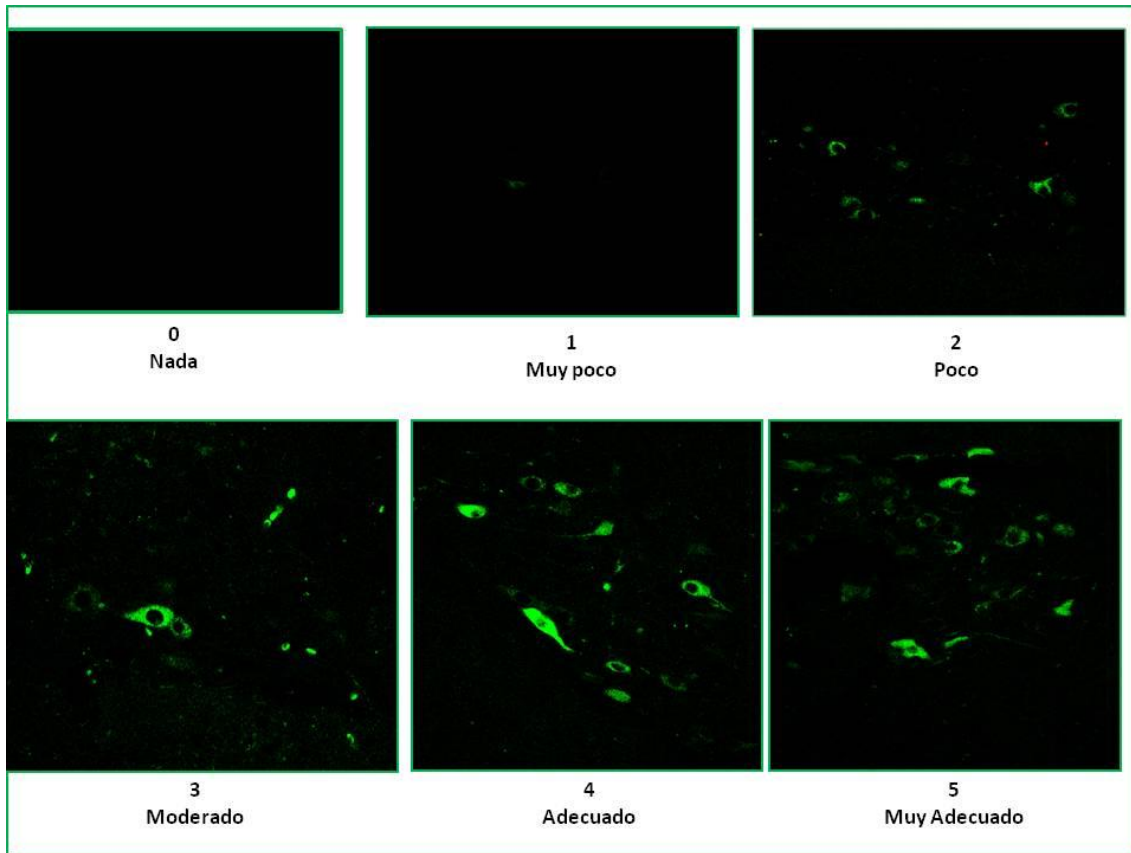
En los cuadros 1 y 2 se presentan ejemplos de la escala cualitativa a considerar para el análisis las de la cantidad de trazado obtenido para cada órgano tomando en cuenta cantidad de neuronas trazadas e intensidad.

### Tejido adiposo



Cuadro 1. Se muestra la escala a considerar para clasificar el trazado de neuronas obtenido del tejido adiposo considerando la cantidad de neuronas trazadas e intensidad. (20x)

Hígado



Cuadro 2. Se muestra la escala a considerar para clasificar el trazado de neuronas obtenido del hígado considerando la cantidad de neuronas trazadas e intensidad. (40x)

En el páncreas no se encontró trazado en ningún corte ni en ninguno de los tiempos en los que se estudió.

En la tabla 2 se presenta el experimento realizado para cada rata por hora, órgano trazado, y si alguno de estos presentaba trazado y de manera cualitativa cuánto trazado mostraba de acuerdo con la escala previamente mencionada.

## RESULTADOS

Tabla 2. Resultados de los experimentos realizados.

Rata	Zt	Fecha de cirugía	Duración de cirugía	Trazado en hígado	Trazado en páncreas	Trazado en tejido adiposo
1	0	2-Ago-17	34min	---	0	5
2	0	2-Ago-17	30min	---	0	1
6	0	18-Ago-17	70min	0	---	0
13	0	6-Sep-17	90min	3	---	5
14	0	6-Sep-17	45min	0	---	3
15	0	8-Sep-17	45min	5	---	3
16	0	8-Sep-17	25min	0	---	1
11	12	2-Ago-17	67min	---	0	2
12	12	2-Ago-17	67min	---	0	2
9	12	16-Ago-17	34min	---	0	2
10	12	16-Ago-17	34min	---	0	2
C	12	6-Sep-17	60min	1	---	4
D	12	6-Sep-17	45min	2	---	5
E	12	7-Sep-17	55min	0	---	4
F	12	7-Sep-17	60min	0	---	0
I	9	18-Ago-17	75min	3	---	4
II	9	18-Ago-17	65min	2	---	5
X*	9	11-Oct-17	30min	1	---	5
XX*	9	11-Oct-17	48min	5	---	5
XXX*	9	11-Oct-17	35min	5	---	5
K1*	6	25-Oct-17	40min	0	---	2
K2*	6	25-Oct-17	30min	0	---	2
K3*	6	25-Oct-17	40min	2	---	5
K4*	6	25-Oct-17	35min	1	---	4
K5*	6	25-Oct-17	35min	2	---	0

Se muestra el tiempo en el que se realizó la cirugía, el tejido trazado y cuánto trazado mostró en los respectivos casos de acuerdo con la escala previamente establecida. \*En estas ratas Zt 0 equivale a las 7:00am, por eso su Zt 6 y Zt 9 es una hora y media antes que las ratas I y II, las cuales su ZT 0 era a las 8:30am. --- No se trazó.

De los 25 animales utilizados, se obtuvo para el TA un 88% de animales trazados. Para el hígado, un 72%. En el páncreas no se observó trazado.

### 4.1 Experimentos en Zt 0

De las 10 ratas operadas en ZT 0 (8:35am), 2 murieron, una en cirugía y otra, días después de ésta. Otra rata se descartó por errores metodológicos.

A 2 ratas se les inyectó trazador en páncreas y en tejido adiposo. Ninguna de ellas presentó trazado desde el páncreas, sin embargo, ambas mostraron trazado desde el tejido adiposo, una muy poco y otra muy adecuado trazado; ambos en el DMV como se muestra en la figura 14.

## RESULTADOS



Fig. 14. Trazado en Tejido adiposo CTB-CY3 en Zt 0. (20X). **A)** Muy poco trazado. **B)** Muy adecuado trazado. 1.27 $\mu$ m

Cinco ratas fueron trazadas en hígado y tejido adiposo. Una no mostró trazado en ninguno de los dos tejidos. Para el hígado dos de ellas no mostraron trazado y una mostró un trazado moderado y la última muy adecuado. Para el T.A una obtuvo trazado muy adecuado, dos de ellas moderado y otra muy poco. Los trazados encontrados fueron en el DMV. Como se muestra en los ejemplos de la figura 15.

## RESULTADOS

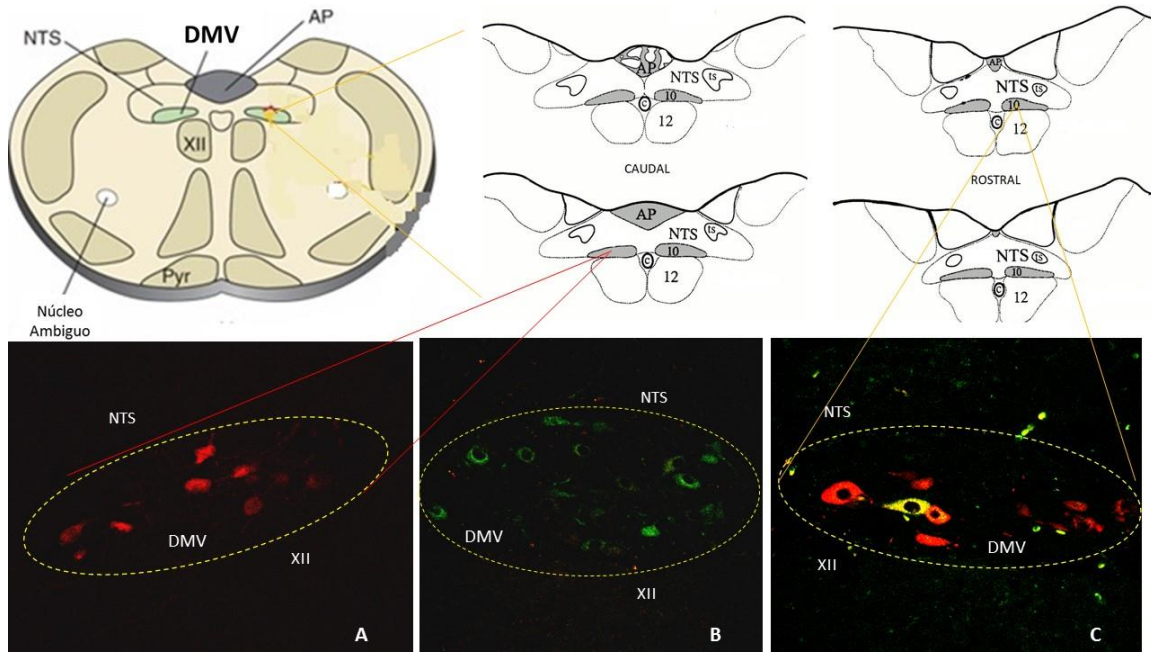


Fig. 15. Ejemplos de los resultados obtenidos en Zt 0. **A)** Neuronas trazadas desde TA. (CTB-CY3) (40x). **B)** Neuronas trazadas muy adecuadas desde hígado con CTB-CY2 (verde) y muy poco en TA con CTB-CY3. (rojo). (40x). **C)** Neuronas con trazado muy adecuado desde TA. (rojo) y moderado en hígado, las cuales se ven amarillas debido a una colocalización de neuronas; la neurona proyecta a ambos tejidos. (40x). 0.64 $\mu$ m

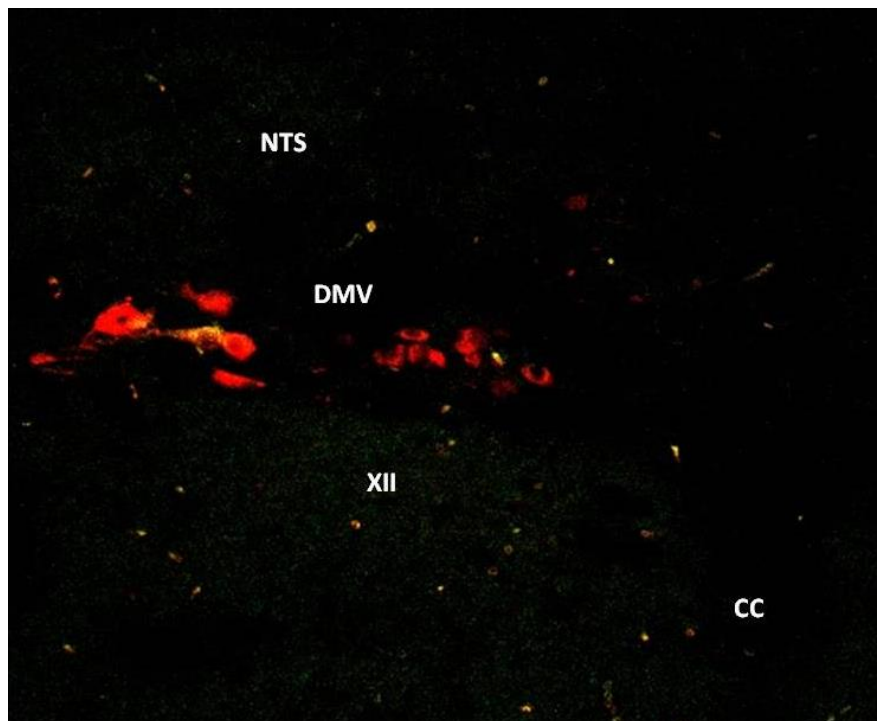


Fig 16. Ejemplo de un trazado moderado de TA con CTB-CY3 e hígado con CTB-CY2 con neuronas colocalizadas (amarillas/ naranjas); estas neuronas proyectan a los 2 tejidos trazados. (20x). 1.27 $\mu$ m.

## RESULTADOS

En este tiempo, los tejidos que mostraron los 2 tipos de trazados presentaban colocación de neuronas, la cual se muestra en la figura 15C y 16 (amarillo/naranja). Estas demuestran que hay neuronas que proyectan tanto a tejido adiposo como al hígado.

### 4.2 Experimentos en Zt 6

Cinco ratas fueron trazadas desde el hígado y T.A en Zt 6. En este experimento cinco de cinco ratas mostraron trazado, sin embargo, no todos los órganos fueron trazados. Los resultados fueron los siguientes, para el hígado dos no mostraron trazado, dos mostraron poco trazado y una de ellas muy poco. En el caso del T.A una de ellas no mostró trazado, dos mostraron poco trazado, una mostró un trazado adecuado y la otra muy adecuado. En la figura 17 se puede observar ejemplos lo descrito en este párrafo.

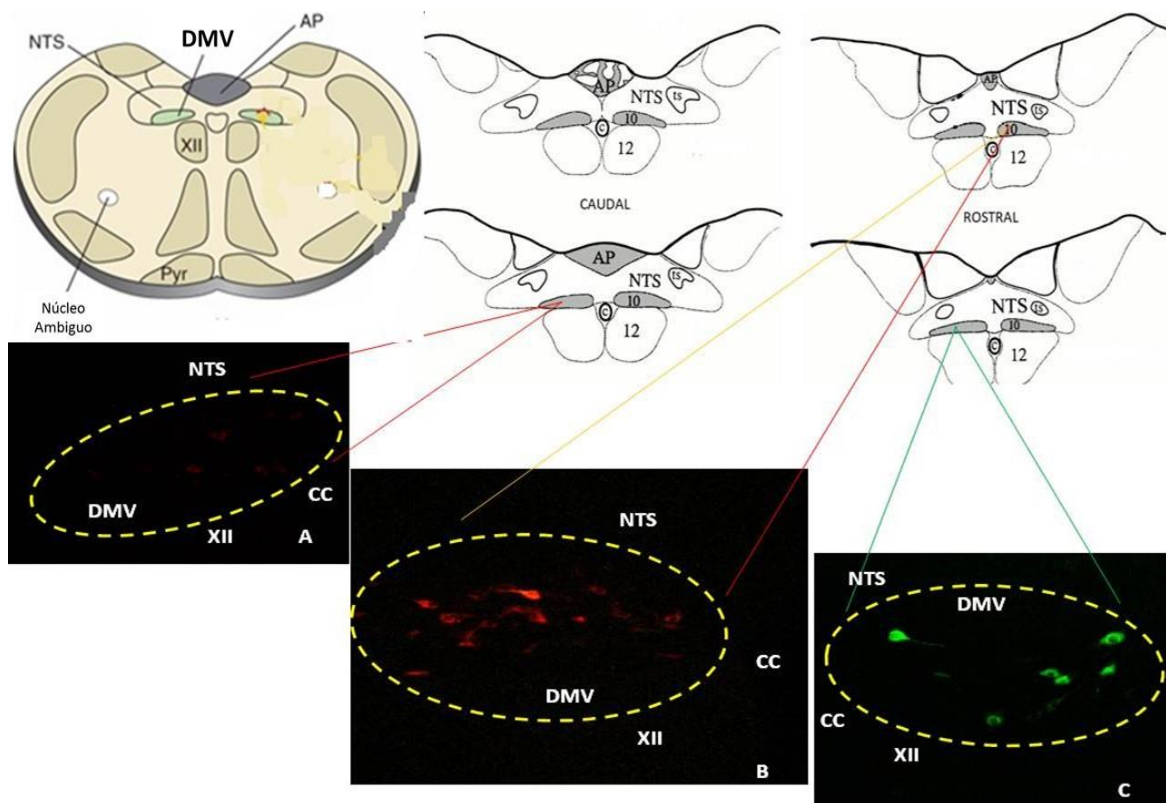


Fig. 17. Ejemplos de los resultados obtenidos en los experimentos en Zt 6. **A)** Poco trazado únicamente en TA con CTB-CY3 (20x). **B)** Adecuado trazado en TA con CTB-CY3. (rojo) y muy poco trazado en hígado (amarillo) (20x). **C)** Poco trazado únicamente en hígado con CTB-CY2 (20x). 0.64 $\mu$ m.

### 4.3 Experimentos en Zt 9

Se trazaron 5 ratas en Zt 9 (17:35pm) desde el T.A e hígado. Para este experimento cinco de cinco ratas operadas mostraron trazado en ambos órganos, además en este tiempo se mostró una mayor concordancia de los resultados obtenidos para el T.A ya que cuatro de ellas mostraron un muy adecuado trazado y únicamente una de ellas un trazado adecuado desde este tejido. Para el hígado una mostró muy poco trazado, una mostró poco trazado, otra un trazado moderado y las últimas dos un trazado muy adecuado. Ejemplos de los resultados obtenidos se muestran en las figuras 18 y 19. En la figura 18C se observa colocación entre neuronas, significando que esta neurona inerva tanto al T.A como al hígado.

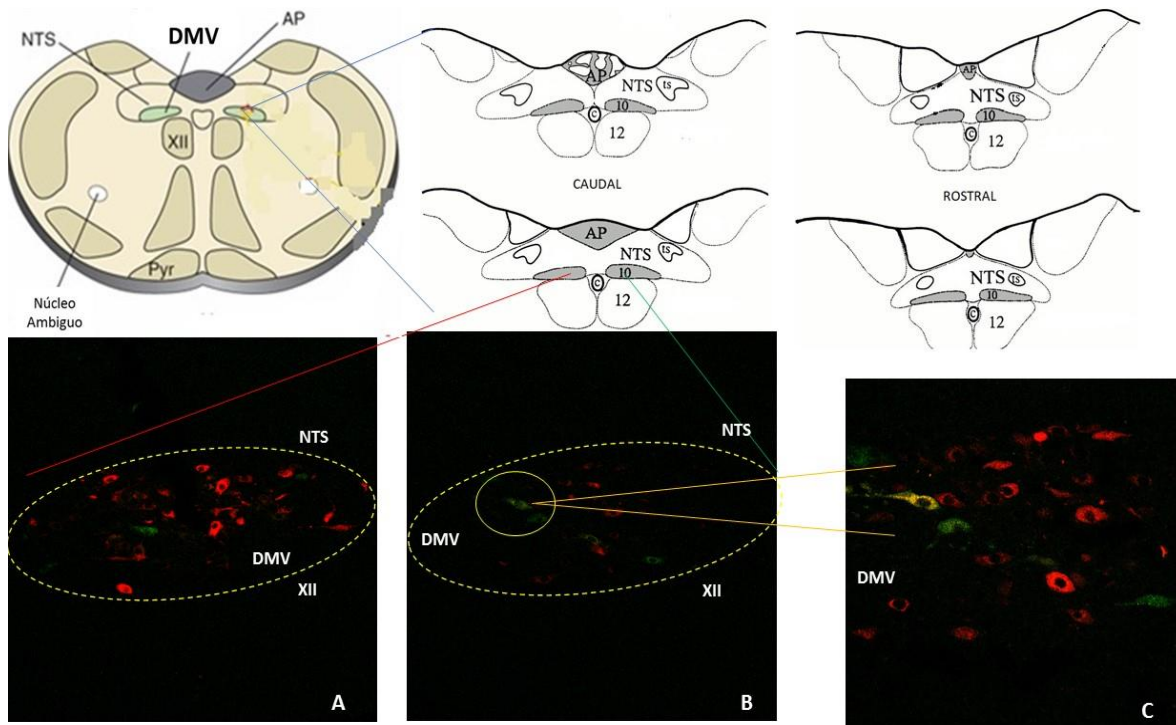


Fig. 18. Ejemplos de tejidos trazados en Zt 9. **A)** Neuronas que muestran muy adecuado trazado en TA con CTB-CY3 (rojo) y poco trazado en hígado con CTB-CY2 (verde) (20x).  $1.27\mu\text{m}$  **B)** Neuronas con adecuado trazado en TA con CTB-CY3 (rojo) y moderado en hígado CTB-CY2 (verde) (20x).  $1.27\mu\text{m}$ . Se muestra colocación de neuronas (amarillo) como se ve en la figura **C)** en 40x.  $0.64\mu\text{m}$



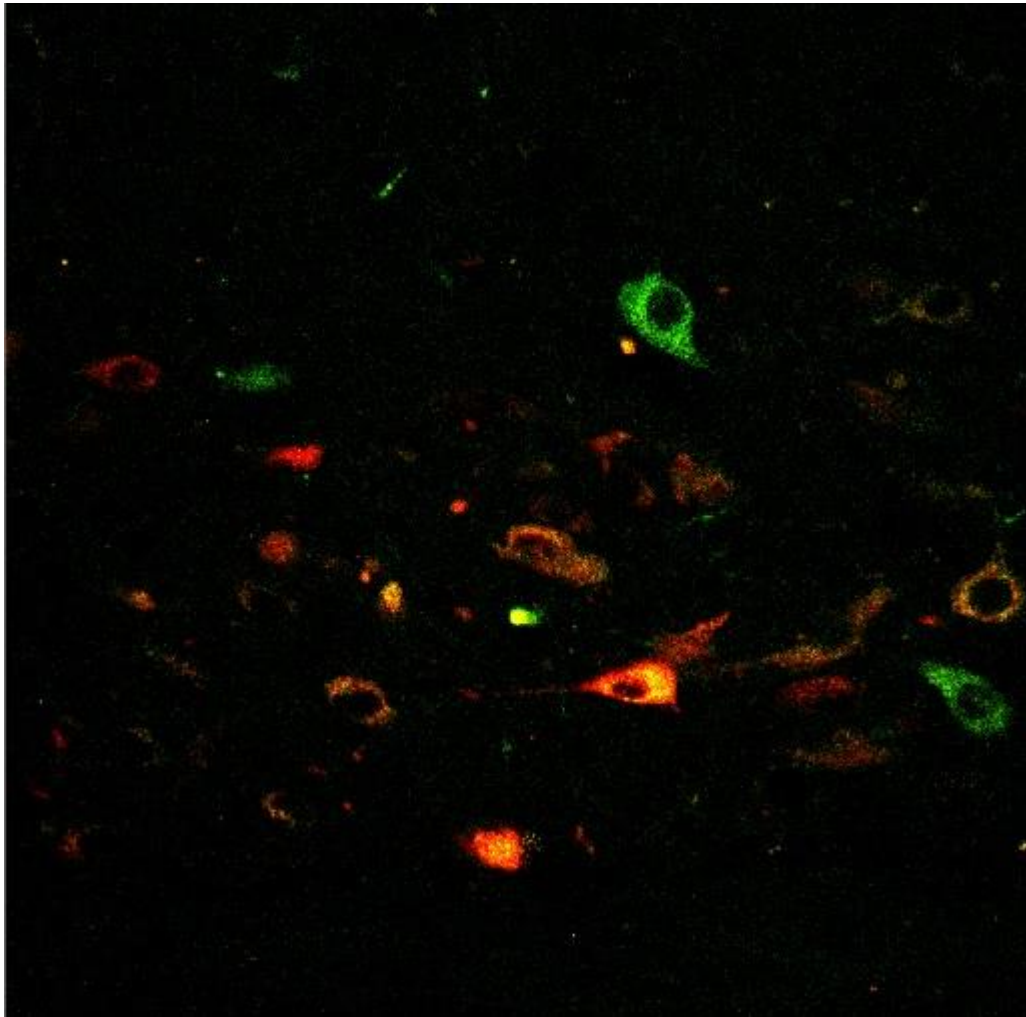


Fig. 19. Ejemplo de neuronas con muy adecuado trazado tanto desde TA con CTB-CY3 (rojo) como de hígado CTB-CY2 (verde). Las neuronas amarillas/naranjas proyectan a ambos órganos. (40x). 0.64 $\mu$ m

#### 4.4 Experimentos en Zt 12

Cuatro ratas fueron trazadas desde el páncreas y tejido adiposo en Zt 12 (20:35pm). Ninguna de ellas presentó trazado de páncreas. Sin embargo, las cuatro presentaron poco trazado desde el tejido adiposo. En la figura 20 se observan imágenes representativas de lo que se observó en estos tejidos.

## RESULTADOS

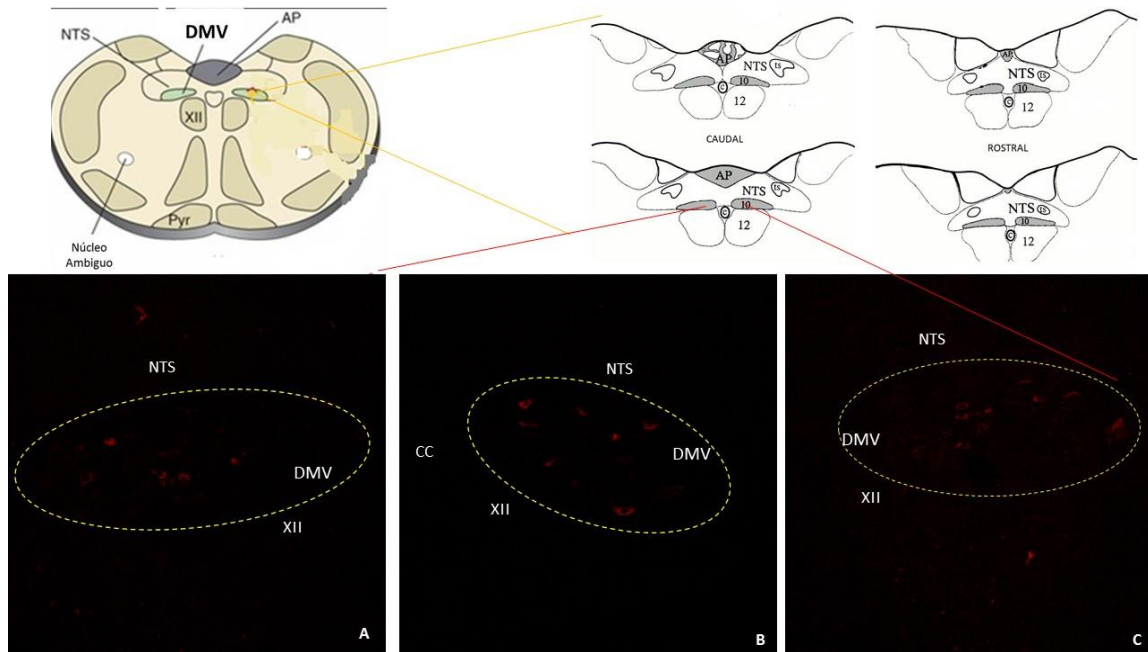


Fig. 20. Neuronas trazadas de los tejidos que mostraron poco trazado únicamente desde el TA con CTB-CY3 (20X). 1.27 $\mu$ m **A**), **B**) y **C**) Poco trazado de TA en DMV.

Otras cuatro ratas fueron trazadas del hígado y tejido adiposo. Una de ellas no mostró trazado en ninguno de los 2 órganos. Para el caso del hígado, una no mostró trazado, una muy poco y la otra poco trazado. Para el tejido adiposo dos mostraron un adecuado trazado y la otra un muy adecuado trazado. En la figura 21 se pueden apreciar ejemplos de lo descrito en este párrafo.

## RESULTADOS

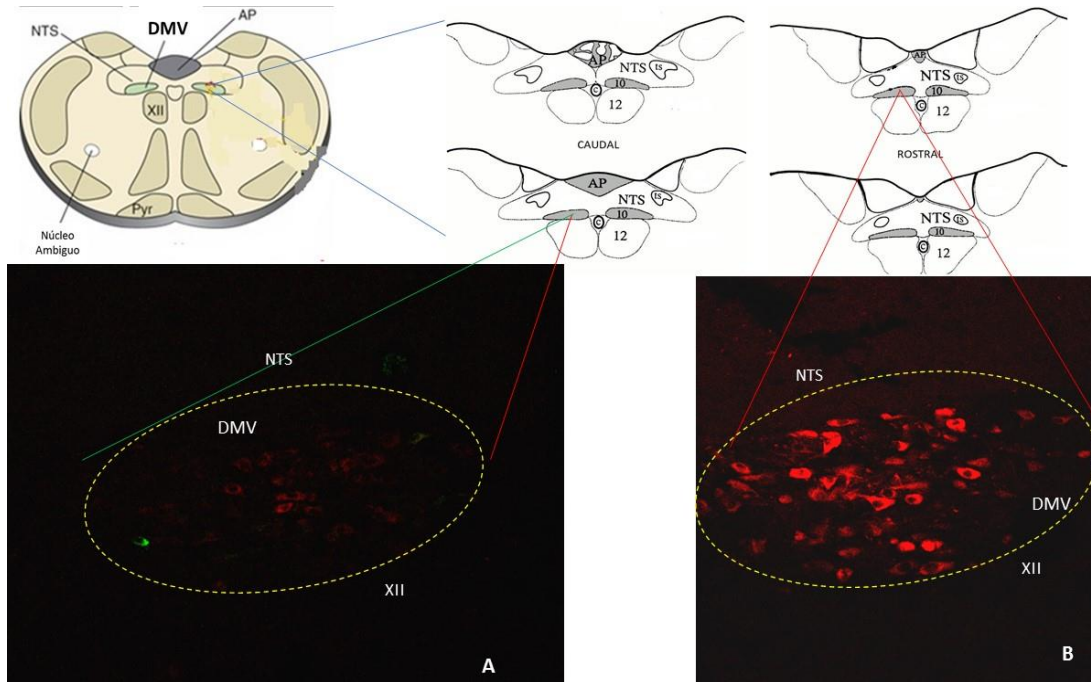


Fig. 21. Ejemplos de neuronas del DMV de ratas trazadas en Zt 12 (20x). 1.27 $\mu$ m **A)** Se muestra un adecuado trazado desde TA con CTB-CY3 (rojo) y muy poco trazado de hígado CTB-CY2 (verde). **B)** Se observa un muy adecuado trazado de TA con CTB-CY3.

### 4.5 El trazado aumenta de la parte más caudal a rostral del Núcleo Dorso Motor del Vago y un lóbulo proyecta en mayor proporción al hígado y tejido adiposo

En ambos tejidos trazados se observaron dos cosas, independientemente de la cantidad de trazado obtenido: 1. En todos los experimentos se muestra que sí se encontró trazado en DMV y el trazado aumenta de la parte más caudal a rostral como se muestran en las figuras 22 y 23.

## RESULTADOS

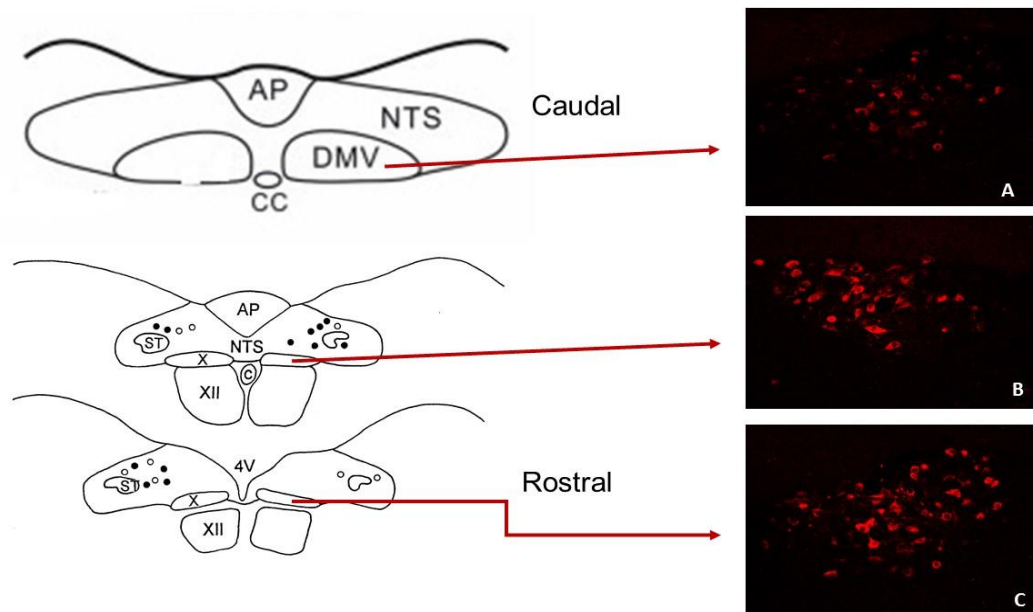


Fig. 22. Se muestra cómo aumenta el trazado de neuronas del TA con CTB-CY3 de un mismo animal, de la parte más caudal (A) a la parte más rostral (C) (20x). 1.27 $\mu$ m

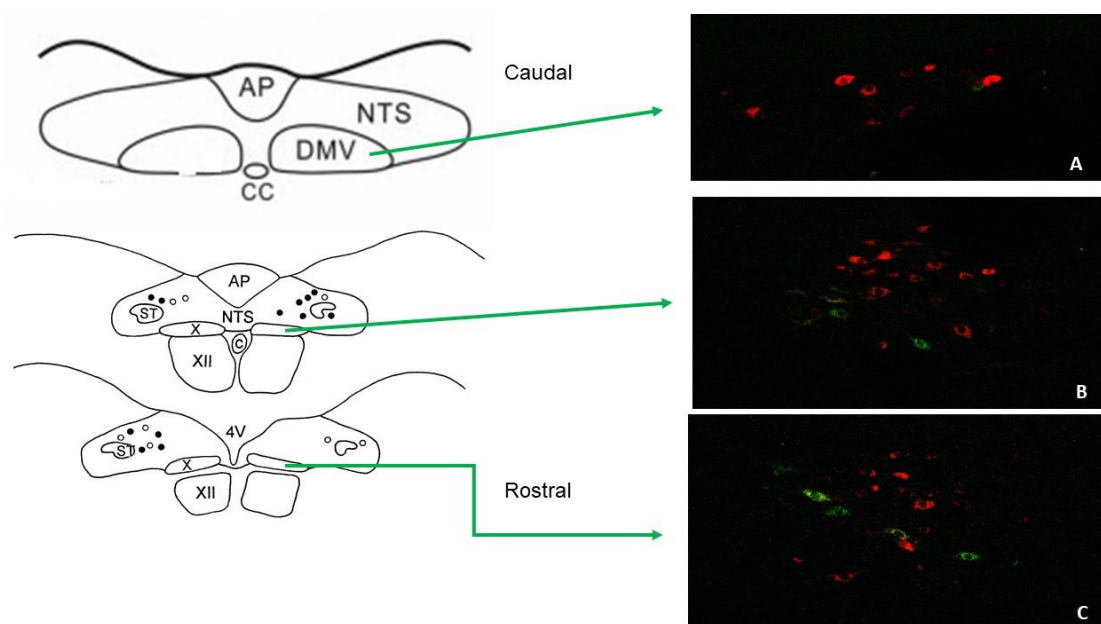


Fig. 23. Se muestra cómo aumenta el trazado de neuronas de un mismo animal de la parte más caudal (A) a la parte más rostral (C) (20x), tanto de TA con CTB-CY3 (rojo) como de hígado con CTB-CY2 (verde). 1.27 $\mu$ m

Este patrón se observó en todos los animales y en ambos tejidos trazados independientemente de la hora del día en que se realizó la cirugía.

## RESULTADOS

2. Ambos lados del DMV presentaban trazado, sin embargo, un lado siempre presentaba mayor cantidad de trazado, como se observa en las figuras 24, 25 y 26.

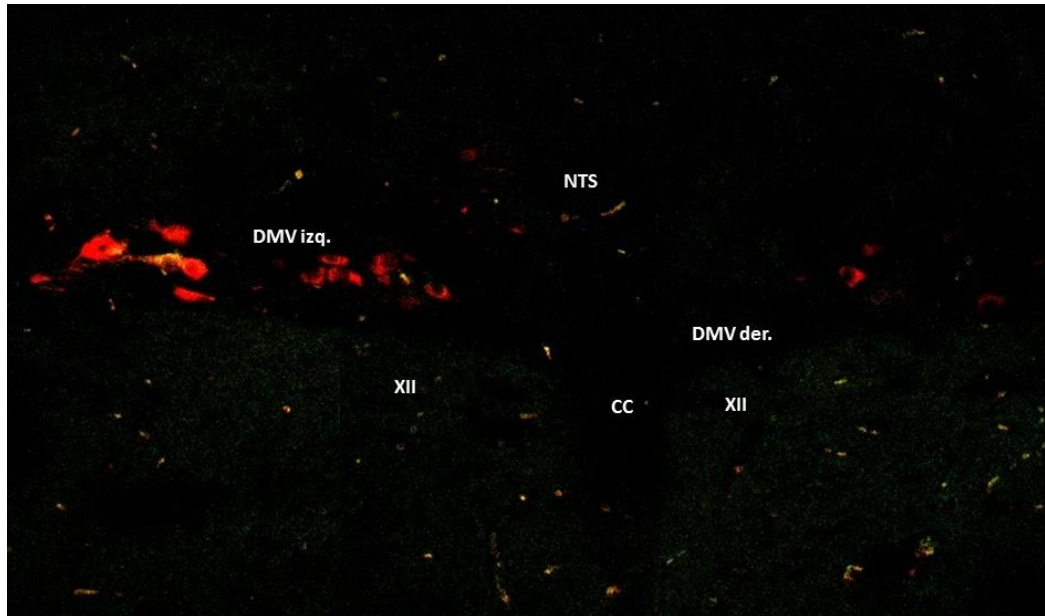


Fig. 24. Neuronas trazadas en ambos lados del DMV, sin embargo, este es mayor en el lado izquierdo, a comparación del lado derecho en Zt 0. (20x).  $1.27\mu\text{m}$ .

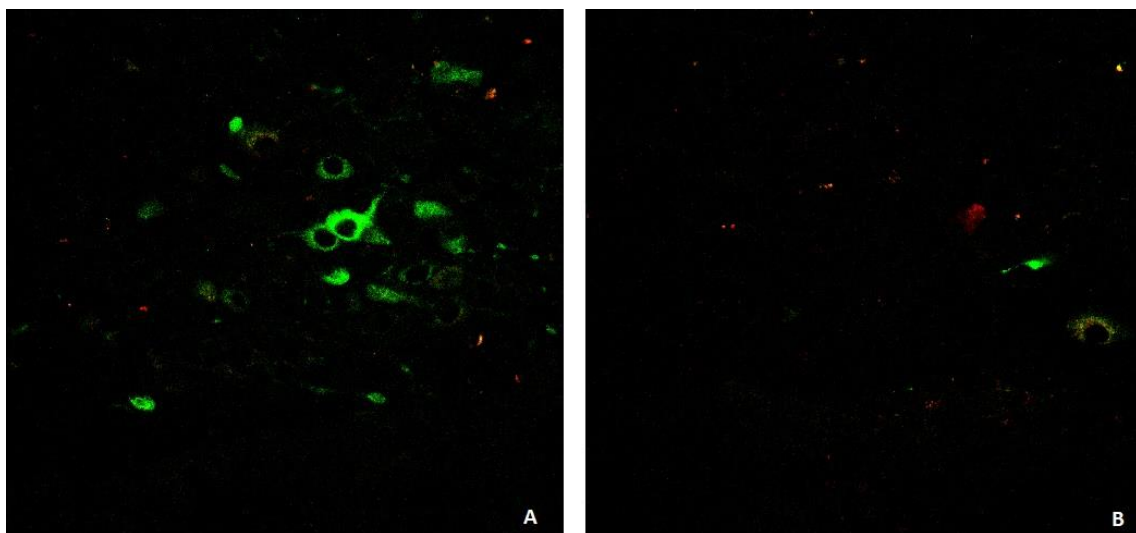


Fig 25. Neuronas trazadas en ambos lados del DMV.  $0.64\mu\text{m}$ . **A)** Más trazado desde el hígado que el lado **(B)** en Zt 0. (40x).

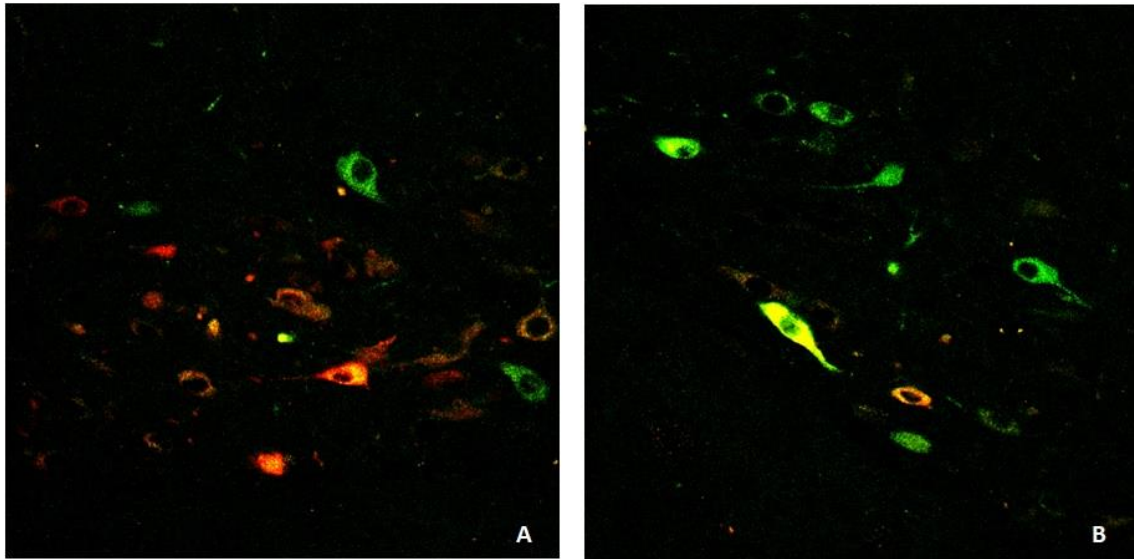


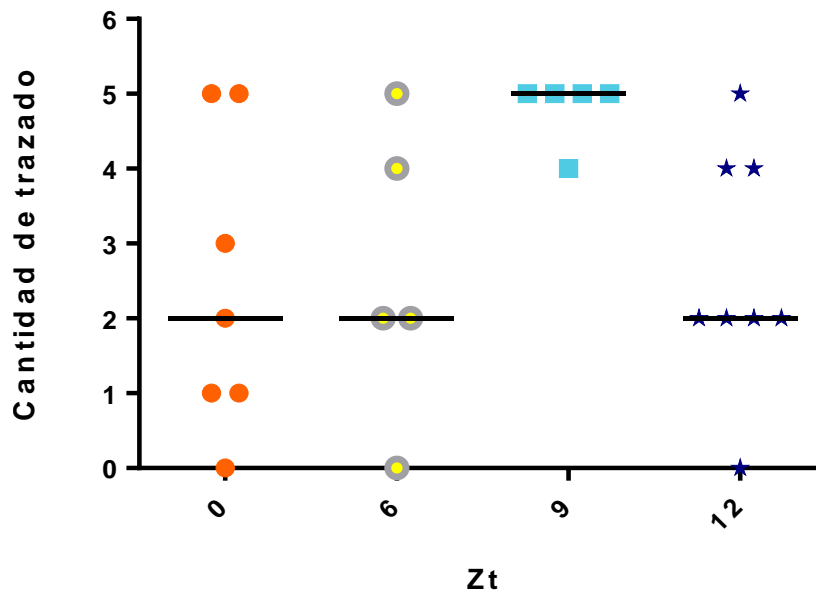
Fig. 26. Neuronas trazadas en ambos lados del DMV, sin embargo, este es mayor en la figura (A), a comparación de la figura (B) en Zt 9. (40x). 0.64 $\mu$ m.

#### 4.6 Gráficas de trazado y análisis estadístico.

##### 4.6.1 Tejido Adiposo

En el caso del TA, se muestra en la gráfica 1 la cantidad de trazado obtenido en cada rata vs. Zt respecto a la escala definida junto con las medianas obtenidas del trazado en tejido adiposo en cada tiempo. Para saber si existe una diferencia significativa entre los trazados obtenidos, se realizó la prueba Kruskal-Wallis en GraphPad Prism 6. La diferencia es significativa si  $P < 0.05$ .

**Trazado en tejido adiposo vs. Zt**



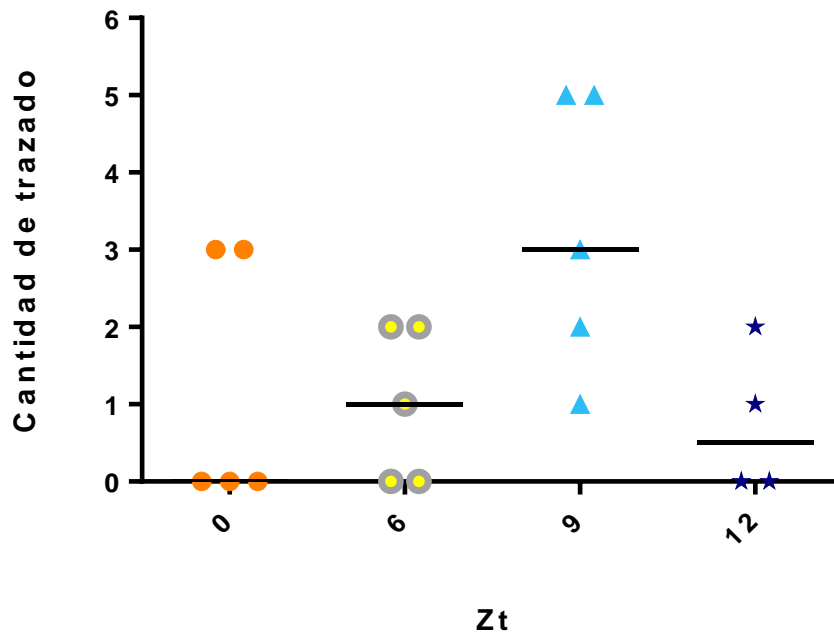
Gráfica 1. Cantidad de trazado de TA en cada rata y medianas de trazados obtenidos en cada hora del día. No se observan diferencias en el trazado del tejido adiposo en los distintos tiempos estudiados ( $P > 0.05$ ).

Después de realizar la prueba Kruskal-Wallis para los resultados obtenidos en tejido adiposo, se obtuvo un valor de  $P = 0.0873$  ( $P > 0.05$ ) por lo que no se observan diferencias significativas entre los distintos tiempos estudiados.

**4.6.2 Hígado**

En la gráfica 2 se muestra la cantidad de trazado desde el hígado vs. Zt respecto a la escala establecida, así como las medianas obtenidas del trazado de hígado en cada tiempo. Para saber si existe una diferencia significativa entre los trazados obtenidos, se realizó la prueba Kruskal-Wallis en GraphPad Prism 6. Un valor de  $P < 0.05$  quiere decir que la diferencia entre los grupos es significativa.

Trazado en hígado vs. Zt



Gráfica 2. Cantidad de trazado obtenido en hígado respecto al tiempo y medianas de los trazados en tejido adiposo obtenidos en cada hora del día. No se observan diferencias en el trazado del hígado en los distintos tiempos estudiados ( $P > 0.05$ ).

Después de realizar la prueba Kruskal-Wallis para los resultados obtenidos en hígado, se obtuvo un valor de  $P = 0.1662$  ( $P > 0.05$ ) por lo que no se observan diferencias significativas entre los distintos tiempos estudiados.

En ambos órganos el tiempo en el que hubo una mayor presencia de trazado fue Zt 9.

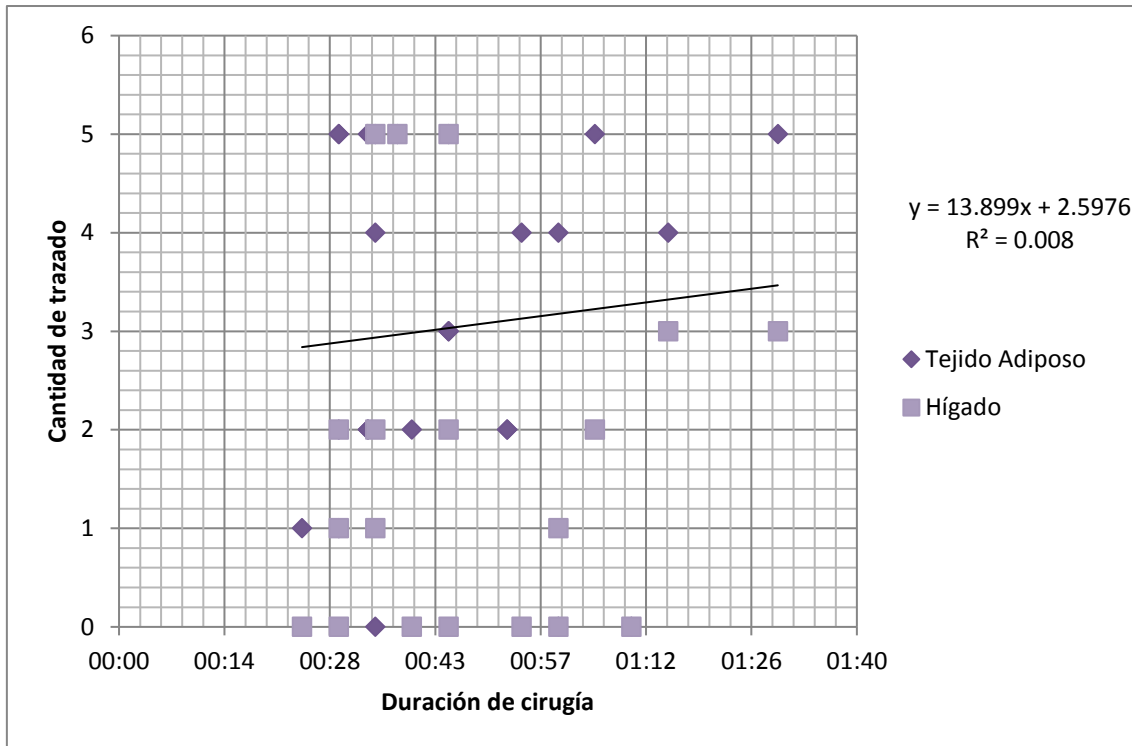
**4.6.3 Correlación: Cantidad de trazado obtenido vs. Duración de cirugía**

En la gráfica 3 se muestra que no hay correlación entre la cantidad de trazado obtenido en hígado y tejido adiposo y la duración de la respectiva cirugía con coeficiente de correlación  $r^2 = 0.008$ . Por lo que no existe correlación entre la cantidad de trazado obtenido en cada tejido ni la duración de su respectiva



## RESULTADOS

cirugía.



Gráfica 3. Correlación entre la cantidad de trazado vs. La duración de cirugía tanto de TA como de hígado. El valor de  $R^2=0.008$ .

## 5. Discusión

### 5.1 El trazado obtenido no depende del tiempo

Para poder analizar los resultados, es importante señalar que en este trabajo se utilizaron ratas, los cuales son animales nocturnos a diferencia de los humanos. En estos animales, su periodo de descanso corresponde a cuando hay luz ambiental. Es importante hacer esta aclaración ya que, en este trabajo se analiza la actividad de dos tejidos con actividad metabólica y si partimos de que ésta se ve afectada por la hora del día en que se encuentre el animal, los tiempos en los que se realizaron todos los experimentos, deberán analizarse bajo esa perspectiva.

En el caso del TA, al comparar el trazado en los 4 tiempos estudiados, la mayor cantidad de cortes donde se observa la presencia del trazador (muy adecuado) se encuentra en Zt 9. Sin embargo, este factor no se ve dependiente del tiempo, ya que se presentan trazados muy distintos en todos los tiempos como se observa en la gráfica 1. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, en donde un valor de  $P=0.0873$  ( $P>0.05$ ) muestra que no hay una diferencia significativa entre el trazado obtenido en Zt 0, Zt 6, Zt 9 y Zt 12. Los resultados obtenidos en este trabajo para el TAB son similares a los obtenidos por Kreier en 2002<sup>53</sup> y 2006<sup>56</sup> aunque este último no realizó el estudio de forma circadiana, ni reporta un porcentaje de trazado obtenido, sin embargo, sí observó amplio trazado desde el TAB hacia el DMV.

Para el hígado no se observa una mayor prevalencia en el trazado obtenido en cada muestra ya que en todos los tiempos, los resultados obtenidos son muy dispersos y no se observa una constante en ninguno de ellos (gráfica 2). No se observan diferencias significativas entre el trazado obtenido en Zt 0, Zt 6, Zt 9 y Zt 12 al haber realizado la prueba de Kruskal-Wallis obteniendo un valor de  $P=0.1662$  ( $P>0.05$ ).

Se observa, sin embargo, que también en Zt 9 existe un trazado ligeramente mayor desde el hígado y el TA. Esto puede sugerir una mayor actividad hepática y del TA en este periodo, ya que el hígado se encarga de la

## DISCUSIÓN

---

producción de glucosa y ésta presenta su acrofase al final del periodo de luz, preparándose al animal para su respectivo periodo de actividad<sup>65</sup>.

Al existir elevada glucosa en sangre, ésta es convertida a piruvato por medio de la glucólisis y posteriormente a acetil-CoA que se condensa con el oxaloacetato para formar citrato, se acumula en el interior de la mitocondria y finalmente sale hacia el citoplasma por medio de su transportador. En el citoplasma, se cataliza la formación de oxalacetato y acetil-CoA, formando malonil-CoA, e inhibiendo a la enzima reguladora de la oxidación de ácidos grasos (acil-carnitina transferasa I), vía que resulta inhibida.

La síntesis de triglicéridos, que se realiza en el citoplasma de los hepatocitos y adipocitos es por medio de la reesterificación de ácidos grasos (recién sintetizados o provenientes de la circulación) y el glicerol.

En el hígado, el glicerol proviene de la degradación de triglicéridos del tejido adiposo. En el tejido adiposo, el glicerol proviene de la reducción de la dihidroxiacetona (un producto de la glicólisis), por lo que la síntesis de triglicéridos en los adipocitos depende de la glicólisis. En el hígado estos triglicéridos son empaquetados como lipoproteínas de baja densidad para ser enviados al TAB a través de la circulación y ser almacenados en gotitas de lípidos en el TAB.

En los adipocitos, la lipólisis resulta inhibida por la desfosforilación e inactivación de la lipasa sensible a hormonas, por lo que la insulina promueve en este tejido la síntesis de triglicéridos, e inhibe su degradación. Además, el TAB libera la leptina, y como se mencionó previamente, en el caso de las ratas, ésta es mayor iniciando su periodo de actividad. Esto último puede explicar el trazado obtenido para el tejido adiposo en este tiempo. De igual manera, un estudio de lipidoma hepático realizado por Adamovich en 2014, muestra que la mayoría de los triglicéridos circulantes provenientes del hígado tienen un pico en Zt 8<sup>66</sup>, esto podría significar una mayor actividad anabólica del hígado en ese tiempo, lo que podría explicar los resultados obtenidos en este trabajo en Zt 6 y Zt 9, ya que los menciona con mayor elevación en el periodo de luz (entre Zt 1 y Zt 8), mientras que en Zt 0, donde se obtuvo muy poco trazado e

## *DISCUSIÓN*

---

incluso una mediana de 0 dentro del grupo trazado en este tiempo (Zt 0), es posible que haya sido por el cambio de fase (de oscuridad a luz) del animal, es decir, debido a la transición del animal entre su periodo de actividad (oscuridad) al de descanso (luz), en el cual muchas funciones anabólicas tienden a disminuir.

Zt 9 es un tiempo cercano al inicio del periodo de actividad de las ratas (Zt 12). En este tiempo se presenta la acrofase de la glucosa<sup>63</sup>, y empiezan los cambios fisiológicos y metabólicos como preparación para el periodo de actividad. El tiempo en el que se observa una “constante” en los resultados es en Zt 9 sugiriendo que a ese tiempo existe una mayor actividad parasimpática en todos los individuos. Sin embargo, la presencia de trazado, así como su ausencia en el resto de los tiempos muestreados y la falta de un patrón claro en relación con el tiempo, puede deberse condiciones fisiológicas del mismo animal, es decir, la cantidad de TAB de éstos o su peso pudieron ser factores que afectaran el hecho que existiera un menor o mayor trazado parasimpático, además de otros factores en la metodología, explicados más adelante.

Para ambos tejidos, se observa que el trazado no depende de la hora del día y que no hay relación entre el número de neuronas trazadas y la intensidad. La inervación parasimpática, así como el trazado en el hígado y TAB son temas de muy amplia discusión y polémica porque diversos grupos de investigación dudan de su relevancia como el caso de Giordano, 2006<sup>55</sup>, por ejemplo, donde no observan trazado significativo o en el caso de Bartness, 2014<sup>67</sup> en donde no se encontró evidencia de inervación parasimpática en el TAB al buscar las fibras en el tejido. Contrario a esto, en este trabajo se observan resultados muy similares a los presentados por Kreier en 2002<sup>53</sup> para el TAB y por Magni en 1983<sup>68</sup> para el caso del hígado, sin embargo, aunque estos estudios no fueron realizados a distintos tiempos como el presente trabajo, la obtención de estos resultados nos indica que es posible que el TAB y el hígado posean inervación parasimpática de forma eferente y aferente, respectivamente. Además, se ha demostrado que la lipólisis se ve aumentada al estimular las fibras simpáticas del TAB y que al realizar una denervación parasimpática, disminuye la captura de glucosa y ácidos grasos libres por el TAB y se aumenta la actividad de la

## *DISCUSIÓN*

---

lipasa sensible a hormonas en un 51%, sugiriendo que, en el TAB la innervación parasimpática es de función anabólica<sup>69</sup>.

El nervio vago es capaz de responder a estados de inflamación<sup>50</sup> y sus aferencias pueden ser activadas por citocinas proinflamatorias como la IL-6 y prostaglandinas como la PGE2 y PGI2, las cuales se liberan en respuesta al daño e inflamación<sup>70</sup>. Al existir esto, el vago se encarga de regular esta inflamación, disminuyendo la cantidad de citocinas liberadas por el tejido. Por lo anterior, es posible que la actividad parasimpática se vea aumentada al existir un estado de obesidad ya que al existir este padecimiento existe inflamación constante del TAB.

Por todo lo anterior, se sugiere que la actividad anabólica presentada en ambos tejidos, indica un aumento en la actividad parasimpática hacia los tejidos estudiados, la cual a su vez, puede generar un mayor transporte axonal y por lo tanto, mayor cantidad de neuronas trazadas (o mayor intensidad).

Se cree que las ratas son animales no estacionales, sin embargo, diversos estudios han observado comportamientos estacionales en ratas en su liberación de hormonas, respuesta a fármacos y comportamiento reproductivo aún en condiciones de luz y temperatura constante. Al momento de analizar los resultados de este trabajo y comparándolos con un experimento del mismo grupo de investigación en el cual también se realizó trazado retrógrado con CTB en tejido adiposo, se observa que es posible que el trazado se vea afectado por el mes del año en que se realiza el trazado. En el trabajo mencionado, se analizó el porcentaje de ratas trazadas vs. el mes del año en que se realizó cada cirugía, y se observó que conforme avanza el año, aumenta el porcentaje de ratas trazadas hasta llegar a los meses julio-agosto-septiembre donde se observa un pico máximo. Posterior a estos meses hasta diciembre, la tendencia de trazado poco a poco va disminuyendo; sugiriendo que el trazado se ve afectado por las estaciones del año o condiciones de temperatura. Por lo anterior, surgió la interrogante de si el comportamiento mencionado, también se presenta en este trabajo. Sin embargo, los resultados no son comparables por el tiempo en que se realizó este trabajo (3 meses), ni por el tipo de análisis realizado. Al momento de realizar este trabajo, la

hipótesis planteada en este párrafo no estaba contemplada, por lo que no se realizaron los debidos experimentos y condiciones para poder observar el fenómeno planteado. Estudios futuros a lo largo del año son necesarios para poder analizar la hipótesis planteada por éstas observaciones.

### **5.2 Siempre a considerar: la metodología.**

El trazado neuronal es una técnica que nos permite estudiar la anatomía del sistema nervioso; desde simples proyecciones, con un trazador monosináptico (como el utilizado en este trabajo, CTB), hasta circuitos neuronales con trazadores multisinápticos como el virus de la pseudorrabia (PRV). En conjunto con otras técnicas, como de inmunohistoquímica o histoquímica se puede obtener mucha información respecto a lo que deseamos estudiar. Aunque existan muchos trazadores anterógrados, retrógrados, transinápticos, virus, toxinas, etc, en ésta sección se hará énfasis únicamente en el trazador retrógrado CTB utilizado en el presente trabajo.

El trazado retrógrado con CTB, como toda técnica, posee ventajas y desventajas. Es una técnica relativamente rápida y sencilla, lo cual presenta una gran ventaja. Al ser una técnica muy sensible representa una desventaja a su vez, ya que se puede ver afectada fácilmente por el sitio de inyección. Como se mencionó previamente, al ser el hígado un órgano con mucha inervación y muy perfundido por la circulación, si no se tiene cuidado al inyectar de manera directa el trazador, éste puede difundir a la circulación o a algún otro sitio que no sea el de estudio. De igual forma, esto pudo haber afectado el trazado, de modo que se observara menos de lo que se podría haber obtenido.

En la técnica de trazado es posible que exista fuga del trazador a la circulación por medio de los vasos sanguíneos, sin embargo, el haber realizado una doble tinción en este trabajo, nos puede sugerir que no hubo fugas, ya que, en cada corte se obtuvieron tanto neuronas doblemente trazadas, como neuronas trazadas únicamente para hígado y/o neuronas trazadas únicamente para TAB. Si hubiera existido algún tipo de fuga, probablemente todas las neuronas estarían doblemente trazadas.

## DISCUSIÓN

---

Se debe tener sumo cuidado en proteger los cortes de la luz ambiental cuando se combina esta técnica con fluorescencia, ya que esta se ve afectada con la exposición a la luz y es posible observarla más débil que la que se podría observar realmente (fotoblanqueamiento)<sup>71</sup>. De igual manera, es importante considerar el tiempo de supervivencia, en este caso del animal una vez trazado, ya que un tiempo muy corto puede resultar en marcaje incompleto y un tiempo mayor de supervivencia podría representar un marcaje inespecífico. El CTB es transportado desde el tejido al soma en 4 días aproximadamente<sup>72</sup> por lo que el tiempo utilizado en este estudio (7 días) es adecuado.

El CTB, para los objetivos de este trabajo, es adecuado, es sensible para los estudios *in vivo*, muestra solo neuronas motoras y de primer orden (que conducen su impulso somático al tronco encefálico). Se pudo observar exitosamente las neuronas del DMV, mostrando que hay algunas especializadas para cada órgano, así como neuronas que comparten ambos tejidos (neuronas colocalizadas).

### **5.3 Las neuronas del Núcleo Motor Dorsal del Vago tienen una organización específica**

En las figuras 24, 25 y 26 se observa que uno de los lados tiene mayor trazado respecto al otro. Esto puede tener diversas explicaciones. Por un lado, el TAB es un tejido bilateral, sin embargo, en este trabajo únicamente se inyectó un solo lado (izquierdo), por lo que podría ser la primera explicación por lo que se observa que un lado presente más trazado que el otro.

Por otro lado, es sabido que los nervios tienen una determinada organización de acuerdo con los órganos a los cuales proyectan. Por ejemplo, en el caso del hígado, en su mayoría las aferencias vagales se encuentran del lado izquierdo. El lado derecho inerva en menor proporción a la rama hepática. Este lado va principalmente al páncreas, al píloro, al duodeno y al antro gástrico<sup>65</sup>. Esto puede ser otra posible explicación de lo observado en las figuras 24, 25 y 26, donde se observa que el trazado es bilateral, pero no en la misma proporción ni de manera uniforme. Además, se ha demostrado que la inervación

## *DISCUSIÓN*

---

parasimpática es distinta según sea la especie de estudio respecto a los neurotransmisores, así como su localización en las distintas zonas del tejido<sup>73</sup>.

El que la cantidad de trazado desde el hígado haya sido menor que desde el tejido adiposo, así como el hecho de que no se mostrara un significativo trazado en el hígado, concuerda con el artículo de Berthoud, 2004<sup>74</sup>. En este reporte se mencionan estudios de trazado retrógrado (como el realizado en este trabajo), que muestran que el hígado es inervado en menor proporción por la rama hepática, mientras que los conductos biliares y el área portal de la vena reciben la inervación aferente vagal más densa<sup>75</sup>. Con esta información, se puede pensar que, además de que la organización de los nervios que recibe el hígado es muy específica, el sitio de inyección del hígado en este trabajo pudo haber afectado los resultados, ya que, aunque se trató de inyectar en el área portal hepática (cerca de la vena), si se inyectó más hacia el área de la rama hepática, se podría explicar el poco trazado encontrado en este tejido.

Estas observaciones son interesantes, sin embargo, en los objetivos de este trabajo no se contemplaba un estudio neuroanatómico, por lo que no se tomaron las medidas y precauciones necesarias para un estudio de este tipo en forma.

Para estudios a futuro, sería interesante añadir alguna técnica para marcar el cerebro para indicarnos qué lado corresponde a cada uno, además para poder comparar la cantidad de trazado de cada lado de manera similar y bajo los mismos criterios se pueden inyectar ambos lados del tejido, para así, dar un resultado concreto y confiable de ésta observación.



## 6. CONCLUSIONES

El trazado no depende de la hora del día.

No hay correlación entre la intensidad de marcaje y la cantidad de neuronas trazadas.

No hay correlación entre la cantidad de trazado ni el tiempo de cirugía del animal.

Aunque no se hayan obtenido diferencias significativas entre los tiempos de trazado, el haber obtenido resultados similares a estudios realizados previamente nos indica que el WAT y el hígado sí poseen neuronas parasimpáticas que proyectan a ambos tejidos, y en el caso de este último es mayor en el área portal hepática.

El DMV es un núcleo bilobulado. Con lo observado en este trabajo, las neuronas de cada lado del DMV tienen una organización específica inervando de forma parasimpática en mayor o menor proporción tanto el hígado como el TA, así como en algunos casos comparten determinadas neuronas.

El trazado es una técnica relativamente sencilla y rápida. Sin embargo, se puede ver afectada por diversos factores como el sitio de inyección, afectando los resultados obtenidos por lo que se debe ser muy cuidadoso al realizarla.

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Johnson Jon. (2016). What is the Function of the Hypothalamus? *Medical News Today*.  
Obtenido en línea de:  
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/312628.php>(16 de septiembre, 2017, a las 22:52pm)
- <sup>2</sup> Coll, A. P. & Yeo, G. S. H. (2013). The hypothalamus and metabolism: integrating signals to control energy and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Pharmacol.***13**, 970–976.
- <sup>3</sup> Kalsbeek, A., Yi, C., Fleur, S. E. La & Fliers, E. (2010). The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.***21**, 402–410.
- <sup>4</sup> Dietrich, M. O. & Horvath, T. L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.***36**(2); 65–73.
- <sup>5</sup> Buijs, F. N. *et al.*(2016). The Circadian System: A Regulatory Feedback Network of Periphery and Brain. *Physiology.***31**. 170–181.
- <sup>6</sup>Ferguson, A. V, Latchford, K. J., & Samson, W. K. (2009). The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus A Potential Target for Integrative Treatment of Autonomic Dysfunction. *NIH Public Access.* **12**(6), 717–727.
- <sup>7</sup> Swanson LW, Kuypers HGJM. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* **194**:555–570.
- <sup>8</sup> Benarroch, E. E. (2005). Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease. 254–263. doi:10.1007/s10286-005-0290-7
- <sup>9</sup> Kalsbeek, A., Foppen, E., Scholij, I., Heijningen, C. Van & Vliet, J. Van Der. (2008). Circadian Control of the Daily Plasma Glucose Rhythm: An Interplay of GABA and Glutamate. *PLoS ONE* **3**(9): e3194.
- <sup>10</sup> Buijs, R. M. & Kalsbeek, (2001). A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nat. Rev.***2**, 1–6.
- <sup>11</sup> Silver, R. & Schwartz, W. J. (2006). The Suprachiasmatic Nucleus is a Functionally Heterogeneous Timekeeping Organ. *Methods in Enzymology*, **393**, 451–465.

## REFERENCIAS

---

- <sup>12</sup>Stephan FK, Zucker I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; 69:1583–1586. [PubMed:4556464]
- <sup>13</sup>Moore RY, Eichler VB. (1972). Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res*; 42:201–206. [PubMed: 5047187]
- <sup>14</sup> Rosenwasser, A. M. (2009). Functional neuroanatomy of sleep and circadian rhythms. *Brain Res. Rev.* **61**, 281–306.
- <sup>15</sup> Márquez de Prado, Blanca. (2004). *Ritmos circadianos y neurotransmisores: Estudios en la corteza prefrontal de la rata*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid. España.
- <sup>16</sup> Gillete, MU, Reppert, SM. (1987). The hypothalamic suprachiasmatic nuclei: circadian patterns of vasopressin secretion and neuronal activity in vitro. *Brain Res Bull.* 19:13-139.
- <sup>17</sup> de la Iglesia HO, Schwartz WJ. (2002). A subpopulation of efferent neurons in the mouse suprachiasmatic nucleus is also light-responsive. *NeuroReport*; 13:857–860. [PubMed: 11997701]
- <sup>18</sup> Rollag, M. D., Berson, D. M. & Provencio, I. (2003). RETINA and Mammalian Photoentrainment. *J. Biol Rhythms*; **18**(3): 227-234.
- <sup>19</sup> Moore, R. Y. (2007). Suprachiasmatic nucleus in sleep – wake regulation. *Sleep Medicine*, **8**, 27–33.
- <sup>20</sup> Sollars, Patricia J. & Gary E. Pickard. (2015). The Neurobiology of Circadian Rhythms. *Psychiatr Clin North Am.* **38**(4): 645–665
- <sup>21</sup> Leon-Mercado, L. *et al.*(2017). The Arcuate Nucleus : A Site of Fast Negative Feedback for Corticosterone Secretion in Male Rats. *eNeuro*, **4**, 1–14.
- <sup>22</sup> Gillete, Martha U. & Angela J. McArthur. (1996). Circadian Actions of melatonin at the Suprachiasmatic Nucleus. *Behav. Brain Res.* 73; 135-139.
- <sup>23</sup> Carlos R, Delgado S, Pardo BF, Briones CE. (2009). La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud mental*, 32(1):69-76.
- <sup>24</sup> Kreier F, Yilmaz A, Kalsbeek A, et al. (2003). Hypothesis: Shifting the Equilibrium From Activity to Food Leads to Autonomic Unbalance and the Metabolic Syndrome BETWEEN INTERNAL AND EXTERNAL ENVIRONMENT. *Diabetes* (52).

## REFERENCIAS

---

- <sup>25</sup> Karlsson B., Knutsson A., & Lindhal B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people. *Occup Environ Med*, 58: 747-752.
- <sup>26</sup> Buijs, R. M. (2013). The autonomic nervous system: a balancing act. *Autonomic Nervous System. Elsevier B.V.* (1<sup>st</sup>. ed., Vol.117).
- <sup>27</sup> Buijs RM, La Fleur SE, Wortel J, et al. (2003). The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *J Comp Neurol*; 464(1):36-48. doi:10.1002/cne.10765.
- <sup>28</sup> Travaglini, R. A., Hermann, G. E., Browning, K. N., & Rogers, R. C. (2003). Musings on the Wanderer: What's New in our Understanding of Vago-Vagal Reflexes? *Am. J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 682, 1–15.
- <sup>29</sup>[www.newworldencyclopedia.org/entry/parasympathetic\\_nervous\\_system](http://www.newworldencyclopedia.org/entry/parasympathetic_nervous_system)  
Fecha de consulta: Martes 11 de julio, 2017 a las 19:59hrs.
- <sup>30</sup> [www.bioenciclopedia.com/sistema-nervioso-humano/](http://www.bioenciclopedia.com/sistema-nervioso-humano/) Fecha de consulta: Lunes 3 de julio, 2017 a las 21:20hrs.
- <sup>31</sup>Watson, C. (2012). Motor Nuclei of the Cranial Nerves. *The Mouse Nervous System*, 490–498. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369497-3.10016-0>
- <sup>32</sup><http://www.iqb.es/diccio/n/nucleo.htm> Fecha de consulta: Miércoles 18 de octubre, 2017 a las 23:39hrs.
- <sup>33</sup>Mussa, B. M., & Verberne, A. J. M. (2013). The dorsal motor nucleus of the vagus and regulation of pancreatic secretory function. *Experimental Physiology*, 98(1), 25–37. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066472>
- <sup>34</sup> Hayakawa, et.al., (2003). *Cells of origin of vagal motor neurons projecting to different parts of the stomach in the rat: confocal laser scanning and electron microscopic study*, 289–297.
- <sup>35</sup>Berthoud, Hans-Rudolf. (2008). The Vagus Nerve, food intake and obesity. *Regul Pept.*149(1-3), 15-25.
- <sup>36</sup> H.R. Berthoud, E.A. Fox, T.L. Powley. (1990). Colocalization of vagal preganglionics that stimulate insulin and glucagon secretion. *Am. J Physiol.* 258; R160-R168.
- <sup>37</sup> Kalsbeek, A., Fliers, E., Romijn, J. A. & Wortel, J. (2001). The Suprachiasmatic Nucleus Generates the Diurnal Changes in Plasma Leptin Levels. *Endocrinology.* 142(6); 2677-2685.
- <sup>38</sup>La Fleur,S.E. (2003). Daily Rhythms in Glucose Metabolism: Suprachiasmatic Nucleus Output to Peripheral Tissue. *J. Neuroendocrinol*, 15(3): 315-322.

## REFERENCIAS

---

---

- <sup>39</sup> Challet, Etienne. (2013). Circadian Clocks, Food Intake, and Metabolism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 119; 105-135.
- <sup>40</sup> Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Fekkes ML, Buijs RM. (2001). A Daily Rhythm in Glucose Tolerance A Role for the Suprachiasmatic Nucleus. :1237-1243.
- <sup>41</sup> Roh, E., Song, D. K. & Kim, M. (2016). Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*. 48; 1-12.
- <sup>42</sup> Seoane-collazo, P., Fernø, J. & Gonzalez, F. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*. 50:276–291.
- <sup>43</sup> Miguelsanz, M. J. P., Parra, W. C., Moreiras, G. V. & Garaulet, M. (2010). Distribución regional de la grasa corporal. Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr. Hosp*; 25(2): 207–223.
- <sup>44</sup> Tchkonina, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metabolism*, 17(5), 644–656.
- <sup>45</sup> Peterson, H. R., Rothschild, M., Weinberg, C. R., Fell, R. D., McLeish K, R. (1988). Body Fat and the Activity of the Autonomic Nervous System. *NEJM*. 318(17); 1077-1083.
- <sup>46</sup> Gesta, S., Tseng, Y. & Kahn, C. R. (2007). Review Developmental Origin of Fat : Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131; 242-256.
- <sup>47</sup> Organización Mundial de la Salud, 2017. Consultado en línea el 19 de diciembre de 2017 a las 18:13hrs. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- <sup>48</sup> Seale, P. & Mitchell A. Lazar. (2009). Brown Fat in Humans: Turning Up the Heat on Obesity. *Diabetes*, 58(7), 1482-1484.
- <sup>49</sup> Kasner, E., Hunter, C. A., Ph, D., Kariko, K., & Ph, D. (2013). Hepatic Nervous System and Neurobiology of the Liver. *NIH Public Access*, 70(4), 646–656.
- <sup>50</sup> Pavlov, V.A. and Kevin J. Tracey. (2012). The vagus nerve and the inflammatory reflex-linking immunity and metabolism. *Nat. Rev.Endocrinol*. 8(12); 743-754.
- <sup>51</sup> Carnethon MR, Jacobs DR Jr, Sidney S, Liu K. (2003). Influence of autonomic nervous system dysfunction on the development of type 2 diabetes: the CARDIA study. *Diabetes Care*. 26(11):3035-3041.
- <sup>52</sup> De Lartigue, G., Barbier de la Serre, C., Espero, E., Lee, J., & Raybould, H. E. (2011). Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in

## REFERENCIAS

---

vagal afferent neurons. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 301(1), E187–E195. <http://doi.org/10.1152/ajpendo.00056.2011>

<sup>53</sup> Kreier, F. *et al.* (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat — functional implications. *J. Clin. Invest*; **110**, 1243–1250.

<sup>54</sup> Aston-Jones, Gary & J. Patrick Card. (2000). Use of pseudorabies virus to delineate multisynaptic circuits in brain: Opportunities and limitations. *Elsevier*; *103(1)*, 51-61.

<sup>55</sup> Giordano, A. *et al.* (2006). White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am. J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 4010; 1243–1255.

<sup>56</sup> Kreier, F., Kap, Y. S., Mettenleiter, T. C., Heijningen, C. Van, Vliet, J. Van Der, Kalsbeek, A., ... Buijs, R. M. (2006). Tracing from Fat Tissue, Liver, and Pancreas: A Neuroanatomical Framework for the Role of the Brain in Type 2 Diabetes. *Endocrinology*, *147(3)*, 1140–1147.

<sup>57</sup> Armengol B. José A. y Francisco Javier Miñano Sánchez. (1995). Bases experimentales para el estudio del Sistema Nervioso. Universidad de Sevilla, España. Pág. 572.

<sup>58</sup> Oztas, Emin. (2003). Neuronal Tracing. *Neuroanatomy*. 2: 2-5.

<sup>59</sup> Velandia Myriam L., Montoya José V., Martínez Marlén, Perdomo Sandra, Castellanos Jaime E. (2002). Comparación de tres técnicas de trazado retrógrado para la identificación del origen espinal del nervio ciático en ratón. *Biomédica*. 22: 529-534.

<sup>60</sup> Lencer, W. I. & Tsai, B. (2003). The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *TRENDS in Biochemical Sciences*. 28(12); 639–645.

<sup>61</sup> Zhang, J. & Xiong, H. (2014). Neuronal Tract Tracing with Light. 45–74 [doi:10.1007/978-1-4614-8794-4](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8794-4)

<sup>62</sup> Luppi, P., Sakai, K., Salvert, D., Fort, P. & Jouvet, M. (1987). Short Communications Peptidergic hypothalamic afferents to the cat nucleus raphe pallidus as revealed by a double immunostaining technique using unconjugated cholera toxin as a retrograde tracer. *Brain Res*. 402, 339–345.

<sup>63</sup> Gage, G.J., Kipke, D.R., Shain, W. (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* (65), e3564.

<sup>64</sup> Paxinos, George and Charles Watson. (2009). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Elsevier*. 6th edition.

- <sup>65</sup> Cailotto, C., La Fleur, S.E., Van Heijningen, C., Wortel, J., Kalsbeek, A., Feenstra, M., et al. (2005). The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasmagluucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? *Eur. J. Neurosci*, 22, 2531-2540.
- <sup>66</sup> Adamovich, Y., Rousoo-Noori L., Zwichaft Z., Neufeld-Cohen A., Golik M., et al. (2014). Circadian Clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. *Cell Metab*, 19(2), 319–330.
- <sup>67</sup> Bartness, T., Liu, Y., Shrestha, Y. & Ryu, V. (2014). Neural Innervation of White Adipose Tissue and the Control of Lipolysis. *Front Neuroendocrinol*. 35(4): 473-493.
- <sup>68</sup> Magni, F. & Carobi, C. (1983). The afferent and preganglionic parasympathetic innervation of the rat liver , demonstrated by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J. of Autonomic Nervous System*. 8, 237–260.
- <sup>69</sup> Kumar Jha, P., Challet, E., & Kalsbeek, A. (2015). Circadian rhythms in glucose and lipid metabolism in nocturnal and diurnal mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 74–88.
- <sup>70</sup> Smith, J. A. M., Amagasu, S. M., Eglen, R. M., Hunter, J. C. & Bley, K. R. (1998). Characterization of prostanoid receptor-evoked responses in rat sensory neurones. *British Journal of Pharmacology*. 124; 513–523.
- <sup>71</sup> Wood, Chris. (2015, Octubre). Fluoróforos y sus aplicaciones. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- <sup>72</sup> Vercelli, A., Repici, M., Garbossa, D. & Grimaldi, A.(2000). Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. **51**, 11–28.
- <sup>73</sup> Akiyoshi, H., Gonda, T. & Terada, T. A. (1998). A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. 352–359.
- <sup>74</sup> Berthoud, H. R. (2004). Anatomy and function of sensory hepatic nerves. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 280(1), 827–835.
- <sup>75</sup> Yi, C., Susanne, E., Fliers, E. & Kalsbeek, A. (2010). The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochimica et Biophysica ActaBBA - Mol. Basis Dis*. **1802**, 416–431.