



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**  
**Instituto de Biotecnología**

EFFECTO DEL AYUNO Y LA RE-INGESTA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS  
NEURONAS TRHÉRGICAS DEL NÚCLEO DORSOMEDIAL DEL HIPOTALÁMO  
EN RATONES MACHO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
HAYDN ESAU URBINA MARURE

TUTOR PRINCIPAL  
DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. LIMEI ZHANG  
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

DR. ENRIQUE ALEJANDRO REYNAUD GARZA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

Cuernavaca Morelos junio 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

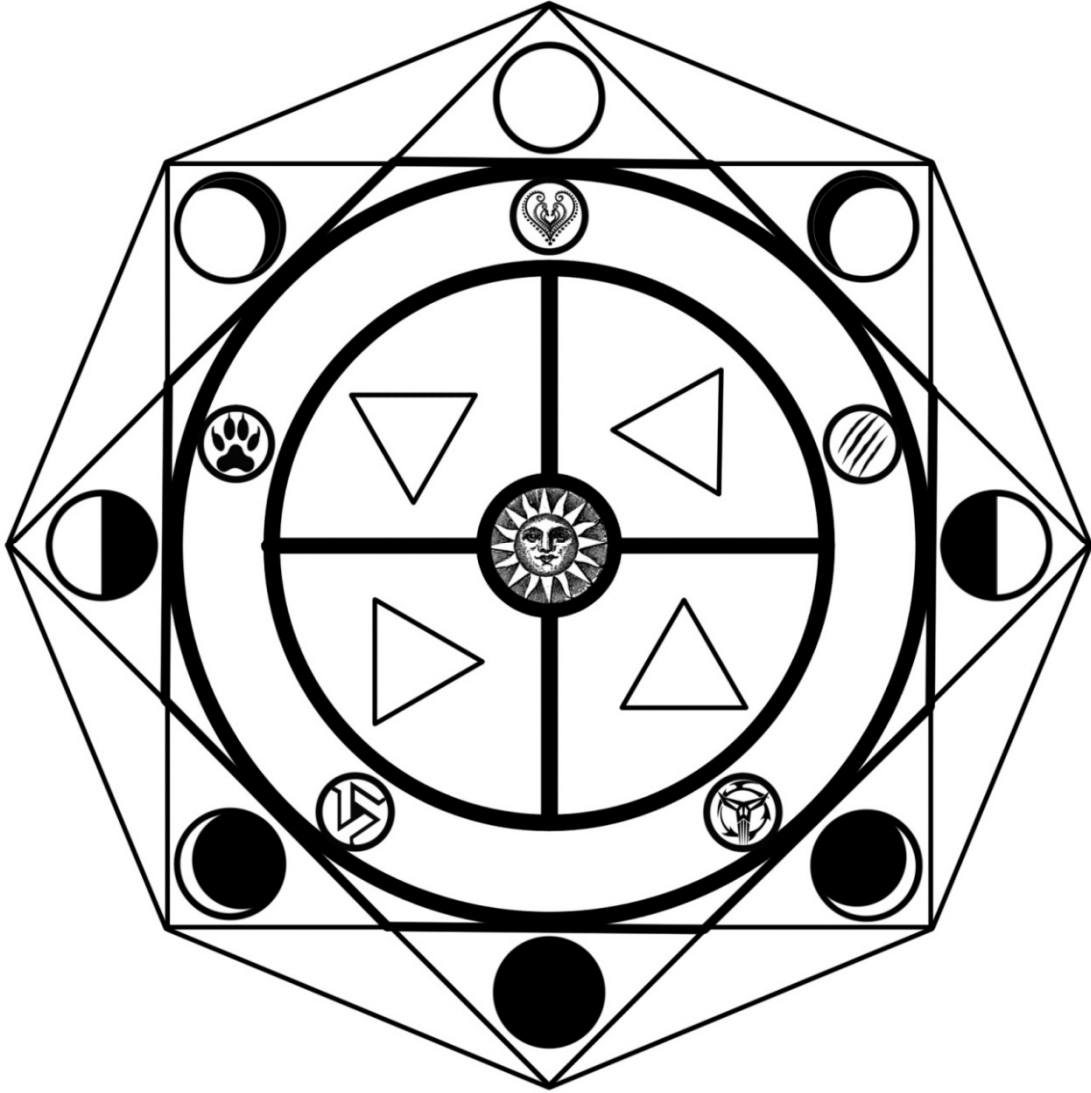


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**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.



## **Dedicatoria**

A mis padres y hermanos, por su infinito amor.

Yo sé que es difícil  
hallar entre las tumbas un lugar para la risa.  
Yo mismo, a veces, caigo,  
y el viento  
levanta mi cara como una alfombra rota,  
pero aun en las celdas,  
bajo la lluvia,  
yo no perdí la fe.

Amigos,  
aunque os golpeen,  
jamás perdáis la fe;  
aunque vengan días sucios,  
jamás perdáis la fe,  
aunque yo mismo os ruegue de rodillas,  
no me creáis,  
amad la vida,  
¡guardad rocío  
para que las flores  
no padezcan las noches canallas que vendrán!

Manuel Scorza

“La humanidad siempre está a prueba. El conflicto y la guerra son el crisol a través del cual evolucionamos. Cada batalla, nos hace más fuertes. Aquellos que caigan serán olvidados. Aquellos que se levanten, sus nombres serán recordados por siempre.”

Akande Ogundimu (Doomfist)

“...Nunca te conté de mi remordimiento por haber matado a tantos para protegernos a todos. Pero siempre hice lo que tenía que hacer. Hasta que un día, no pude arrebatar una vida. Dudé y todo cambió. La gente que debí haber protegido, murió. Y ahí quedé yo, gravemente herida. El mundo pensó que había muerto, yo creí que así era mejor. He perdido tanto en mi vida. Me he despedido de tantos amigos. He visto como entierran a los que más he amado. Pero... Pese a todo lo que he perdido, sé que aún hay quienes deben ser protegidos. Así que no puedo dejar de luchar. Todavía no. No, mientras haya alguien que aún me espere. No, mientras haya alguien que aún me necesite...”

Ana Amari

“¿Opciones? ¡¡Qué sabes tú de opciones!! 30 millones de niños huérfanos, yo era uno de ellos. La guerra ómnica nos dejó sin opciones. Para sobrevivir se hacía lo necesario. Robar o pasar hambre. Matar o morir. Ayudabas a tus amigos y atacabas al que se cruzara en tu camino. Si ansiabas sobreponerte a tus circunstancias, cuando alguien te ofrecía ayuda, aunque fuera el diablo, la aceptabas. No era muy complicado, al menos eso me decía a mí mismo. La verdad es que, tenía muchas opciones y decisiones. Pero cuando te crees un hombre rudo, es difícil admitir que no eres valiente. Es aún más difícil cuando entiendes que ganarse la vida, no es suficiente. Debes marcar la diferencia. Voy a luchar por un mundo mejor. Para algunos eso significa un vendaje, para otros una bala. Hoy tú eliges.”

Jean-Baptiste Augustin

“Si tienes la información, tienes todas las cartas. Todo se puede hackear, hasta las personas. La información es poder.”

Sombra (Olivia Colomar)

“Vivimos atormentados por los misterios de la creación. La ciencia puede revelar los secretos detrás de esas preguntas. Lo que aprendamos, podría darnos acceso al verdadero potencial de la humanidad [...] ¿Y con este nuevo conocimiento, qué nuevo mundo podríamos construir?”

Moira O'Deorain

“Vive con honor, muere con gloria”

Balderich von Adler

## **Agradecimientos**

Le doy gracias al Eterno por haberme permitido llegar hasta aquí con todos los vicios y virtudes que me hacen humano. Durante este proceso aprendí muchas cosas nuevas sobre el mundo que me rodea. Gracias a esto, me di cuenta que me gustan las neurociencias y que puede combinarse con el estudio de los microorganismos.

**A mi mamá:** María Eugenia Marure Alviter. Gracias a ti, entendí perfectamente que hacer un cambio siempre implica el cuestionarse las creencias que se tienen. Que poner a prueba lo ya conocido puede conducirnos a resultados bastante innovadores y gratificantes, pero todo conlleva un riesgo. Me enseñaste que cada jugada debe estar siempre lo mejor pensada posible para estar siempre preparado para cualquier resultado.

**A mi papá:** José Manuel Urbina Arenas. Gracias por enseñarme que sólo yo puedo creer en mí mismo. Gracias por enseñarme que para saber de lo que soy capaz de hacer, siempre debo intentarlo. Contigo aprendí que la vida no es cuestionarse quiénes son los buenos y quiénes son los malos, aprendí que el amor es el perdón absoluto.

**A mi hermana:** Eunice Libertad Urbina Marure. Gracias por escucharme y guardar varios de mis secretos. Por ti, me di cuenta del valor que tiene nuestra familia. Entendí que pase lo que pase, siempre seremos familia.

**A mi hermano:** José Manuel Urbina Marure. Durante este proceso logré entenderte un poco más. Gracias por enseñarme que soy más capaz de lo que creía. Gracias por enseñarme a ser valiente.

**A mi abuela:** María Elena Alviter Benitez. Mamá Elena. Gracias por enseñarme a mantener la mente abierta. Gracias por escucharme en todo momento y por proteger varios de mis secretos. Gracias por tener siempre un lugar para mí en tu mesa.

**A mi abuelo:** Manuel Urbina Robles. Papá Manuel. Te extraño mucho. Gracias por compartir conmigo tu tiempo para ver películas y series. Me enseñaste que nunca es tarde para cambiar, fuiste bastante claro al mostrarme las consecuencias de aceptar y no aceptar la ayuda que nos ofrecen nuestros seres queridos. Nos volveremos a ver.

**A mi tía:** Reyna Marure Alviter. Gracias por recordarme el porqué de las decisiones que he tomado.

**A mi amigo:** Julio Guerrero Castro. Contigo me quedó claro que el verdadero enemigo de la humanidad es el desorden. Gracias por enseñarme a ser más ordenado. Gracias por escucharme y ayudarme en todo momento. Gracias por tus comentarios tan inteligentes que me dijiste en este proyecto y siempre. Me enseñaste a pensar como un científico. Gracias.

**A mi amigo:** Ulises Dantán Dichi. Gracias por siempre recordarme que hay virtud en mí. Gracias por siempre escucharme y por decirme que de los errores siempre se aprende. Gracias por siempre ser honesto y por hacerme reír cuando el mundo se estaba acabando.

**A mi amiga:** Lidia Dalia Ereiva González. Gracias por compartir una clase conmigo. Gracias por mostrarme la importancia del dinero y del tiempo.

**A mi amiga:** Yazmin Rojas Cuevas. Gracias por siempre confiar en mí. Gracias por mantenerte siempre en contacto, aun cuando yo he estado tan distante. Gracias por mostrarme los frutos de perseverancia.

**A mis overamigos:** Gabriel (Tapir), Itzel (Itzel), Rodrigo (Rahbm), Dennise (Elfowo), Jorge (Kioro), Jhonatan (Jednoctis) y a toda la banda. Muchas gracias por escuchar todas mis ocurrencias, gracias por compartir memes muy graciosos. Gracias porque dentro del relajo siempre encontré confianza y mucha risa. Gracias por sus consejos.

**A mi director de tesis:** Jean-Louis Charli Casalonga. Gracias por permitirme estar en su laboratorio. Gracias por siempre escucharme y darme consejos. Gracias por siempre ser honesto. Gracias a usted, entendí que la alegría no está peleada con la profesionalidad.

Gracias Dra. Limei Zhang por brindarme ayuda a lo largo de este proceso y por sus preguntas tan puntuales.

Gracias Dr. Enrique Alejandro Reynaud Garza por enseñarme a tener seguridad de mis resultados y por sus consejos en este proceso.

Gracias Dra. Rosa María Uribe Villegas por mostrarme tanta profesionalidad al trabajar y por ayudarme con los experimentos. Gracias por siempre ser honesta.

Gracias Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez (Tony) por ayudarme con las extracciones de DNA. Gracias por escucharme siempre.

Gracias Maestra Hilda Constantino Castro por acompañarme en ese día de tanta tristeza. Gracias por su apoyo.

Gracias Dr. Vito Hernández por ayudarme a hacer pruebas de IHC.

Gracias Karla Yamili Vargas Orihuela por enseñarme cómo se perfunde un ratón y por mostrarme como haces las ISH y las IHC.

Gracias Dra. Georgina Ponce Romero por enseñarme bioquímica de lípidos y por siempre escucharme. Gracias por siempre ser honesta y darme consejos sobre la vida y sobre lo académico. Gracias por enseñarme a ver las cosas desde una perspectiva diferente.

Gracias Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo por enseñarme la prudencia del silencio.



Gracias Dra. Mariana Mariscal Gutiérrez por enseñarme a ser crítico con los resultados que se obtienen.

Gracias Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy por compartir los datos que has obtenido de tus investigaciones y por enseñarme la importancia de una sonrisa.

Gracias Lic. Antonio Bolaños Guillén por ayudarme en todo lo administrativo. Gracias Toño por ser tan buen amigo y comprensible en todo momento. Gracias por todo.

Gracias a todo el equipo del bioterio del IBT por todo el apoyo que he recibido. Gracias especialmente a la Dra. Maria Elena Elizabeth Mata Moreno por siempre escucharme en todo momento y por brindarme el apoyo necesario con las salas del bioterio. Muchas gracias a la Dra. Graciela Margarita Cabeza Pérez por siempre estar dispuesta a enseñarme distintas técnicas para manipular a los animales y distintos procedimientos sobre éstos.

Gracias a todo el equipo del laboratorio del Dr. Charli por todo su profesionalismo y observaciones.

Finalmente, agradezco la Dirección General de Asuntos Académicos de la UNAM, que apoyó los proyectos PAPIIT IN208515 y IN209018, fuentes de financiamiento de los experimentos reportados en esta Tesis.

## Índice

0. Resumen .....	11
1. Introducción .....	15
1.1 Balance de energía.....	15
1.2 Hipotálamo y balance de energía.....	17
1.3 El núcleo dorsomedial del hipotálamo y el balance de energía.....	20
2. Antecedentes .....	23
3. Justificación.....	27
4. Hipótesis .....	27
5. Objetivo general .....	27
6. Objetivos particulares .....	28
7. Materiales y métodos.....	28
7.1 Animales.....	28
7.2 Sacrificio de los ratones por perfusión.....	29
7.3 Criopreservación de cerebros.....	29
7.4 Sección de los cerebros en rebanadas coronales .....	30
7.5 Montaje de rebanadas de cerebro en laminillas cargadas .....	31
7.6 Obtención de células competentes .....	31
7.7 Transformación de células competentes.....	32
7.8 Criopreservación de células transformadas .....	32
7.9 Extracción del plásmido pGEM-T con el inserto de TRH.....	33
7.10 Cuantificación de ácidos nucleicos .....	33
7.11 Electroforesis en agarosa para DNA.....	33
7.12 Linearización del plásmido pGEM con el inserto de <i>Trh</i> .....	34
7.13 Síntesis de las sondas de RNA sentido y antisentido contra el mensajero de <i>Trh</i> marcadas con digoxigenina.....	35
7.14 Caracterización del transcrito por electroforesis en agarosa.....	35
7.15 Determinación de la incorporación de digoxigenina al transcrito por “dot blot” .....	36
7.16 Inmunohistoquímica contra c-Fos.....	36
7.17 Hibridación <i>in situ</i> contra el mensajero de <i>Trh</i> .....	37
7.18 Cuantificación de la hibridación <i>in situ</i> e inmunohistoquímica .....	39
7.19 Estadística.....	39
8. Resultados.....	40

<b>8.1 Efecto del ayuno y de la reingesta en el consumo de alimento y la masa corporal de los animales</b> .....	40
<b>8.2 Visualización del núcleo dorsomedial</b> .....	41
<b>8.3 Síntesis de sondas marcadas con UTP-digoxigenina sentido y antisentido del ARN mensajero de TRH</b> .....	43
<b>8.4 Inmunohistoquímica contra c-Fos</b> .....	44
<b>8.5 Inmunohistoquímica de c-Fos e hibridación <i>in situ</i> para el mensajero de <i>Trh</i></b> .....	46
<b>9. Discusión</b> .....	50
<b>11. Perspectivas</b> .....	54
<b>12. Referencias</b> .....	55

## 0. Resumen

El balance energético de un animal es el resultado de la ingesta de alimentos, la excreción y el gasto calórico. En respuesta a señales que indican estados alterados de dicho balance, o que anticipan necesidades, circuitos del sistema nervioso central emiten señales que controlan comportamientos y salidas endócrinas y autonómicas. Algunos de estos circuitos centrales generan señales orexigénicas, otros generan señales anorexigénicas. Una de esas señales es la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la cual es sintetizada en distintos núcleos del hipotálamo. Se sabe que, si se inyecta TRH de forma intracerebroventricular o intrahipotalámica en ratas, el consumo de alimento disminuye dependiendo de la dosis administrada; lo cual indica que la TRH puede tener una función anorexigénica. Sin embargo, no se sabe cuáles son las neuronas TRHérgicas que transmiten información anorexigénica. Empero, en ratas se ha mostrado que las neuronas TRHérgicas del núcleo dorsomedial (DMN) son inhibidas durante un ayuno, por lo que este núcleo pudiera albergar neuronas TRHérgicas que censan información metabólica y la transmiten a neuronas del hipotálamo lateral que controlan la ingesta. Debido a que los ratones permiten mayores herramientas para manipular las neuronas que las ratas, en esta tesis se analizó el estado funcional de las neuronas del DMN en ratones adultos sometidos a ayuno y reingesta, como un paso preliminar a un estudio más profundo de estas neuronas. Se trabajó con 3 grupos de animales, de los cuales a) el grupo control siempre tuvo acceso a comida y agua *ad libitum*, b) el grupo ayunado tuvo acceso a agua *ad libitum* pero pasó por un periodo de ayuno de 1 día (10:00 am – 10:00am) y c) el grupo con reingesta pasó por un periodo de ayuno y posteriormente tuvo acceso libre a la comida por 3 h. Se fijaron los tejidos por perfusión *in vivo*, se extrajeron los cerebros de los animales y se rebanaron. En rebanadas coronales que incluían el DMN, se realizaron hibridaciones *in situ* contra el mensajero de *Trh* e inmunohistoquímicas para c-Fos, el cual es un marcador de actividad celular. A través de microscopía óptica, se hizo un conteo del número de células positivas para el ARN de *Trh*, para c-Fos o para ambos. El análisis estadístico mostró que no hubo cambios significativos entre

animales alimentados *ad libitum* y animales ayunados; en cambio, se detectó un incremento significativo del número de células c-Fos positivas, ARNm *Trh* positivas y doble marcadas en el grupo de reingesta en comparación con el grupo ayunado. Con base en lo encontrado en este trabajo y en lo reportado en la literatura, se concluye que muy probablemente la población de neuronas TRHérgicas del DMN de ratones adultos machos es sensible a información metabólica. Es posible que estas neuronas generen una señal anorexigénica durante la reingesta, y que contribuyan a generar saciedad. Sin embargo, los datos apuntan a diferencias entre ratas y ratones que tendrán que ser tomadas en cuenta para futuros análisis.

## Abreviaciones

- 3V = Tercer ventrículo
- AGRP = Proteína relacionada a Agouti
- AH = Hipotálamo anterior
- AM = Amígdala
- Aprox. = Aproximadamente
- ARC = Núcleo arcuato hipotalámico
- BAT = Tejido pardo adiposo
- BDNF = Factor neurotrófico del cerebro
- BNST = Núcleo del lecho de la estría terminal
- CART = Transcrito regulado por Cocaína y Anfetamina
- CC = Cuerpo Calloso
- CCK1 = Colecistoquinina 1
- CCX = Corteza cerebral
- CRH = Hormona liberadora de corticotropina
- D.O. = Densidad óptica
- DAB = 3,3-Diaminobencidina
- DMN = Núcleo dorsomedial hipotalámico
- DNA = Ácido desoxirribonucleico = ADN
- FAA = Actividad anticipatoria a la ingesta
- FX = Fórnix
- GABA = Ácido γ aminobutírico
- GLP-1 = Péptido 1 Similar al Glucagón
- HI = Hipocampo
- LH= Hipotálamo lateral
- HPA = Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal
- HPT = Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides
- I.c.v. = Intracerebroventricular
- IHC = Inmunohistoquímica
- ISH = Hibridación *in situ*
- KO = “Knockout” = nulo para un gen
- LB = Medio Luria-Bertani
- LHA = Área Lateral del Hipotálamo
- MCH = Hormona concentradora de la melanina
- ME = Eminencia Media
- Min = minutos
- MPA = Área Media Preóptica
- NAc = Núcleo Accumbens
- NPY = Neuropeptido Y
- OC = Quiásma Óptico
- ON = “Overnight” = Toda la noche

- ORX = Orexina
- PFA = Área Perifornical
- PO = Núcleo preóptico hipotalámico
- POA = Área Preóptica Hipotalámica
- POMC = Pro-opio Melanocortina
- PVN = Núcleo paraventricular hipotalámico
- PYY = Péptido YY
- RFRP = péptido de la familia Arg-Phe-amida
- RNA = Ácido Ribonucleico = ARN
- SE = Septum
- TA = Temperatura ambiente
- TH = Tálamo
- TRH = Hormona liberadora de tirotropina
- TRH-R1 = Receptor 1 de TRH
- TRH-R2 = Receptor 2 de TRH
- TrKB = “Tropomyosin receptor kinase B” = Receptor de BDNF
- TSH = Hormona estimulante de la tiroides
- UCN3 = Urocortina 3
- UCP1 = Proteína desacopladora de la cadena respiratoria 1
- VMN = Núcleo Ventromedial hipotalámico
- $\alpha$ -MSH = Hormona estimuladora de melanocitos  $\alpha$

## **1. Introducción**

### **1.1 Balance de energía**

En los animales, el balance energético es el resultado de los procesos de ingesta de alimentos, excreción y gasto calórico; dicho balance es un factor determinante del peso corporal en humanos (Portillo-Baquedano et al., 2005) y en otros animales. Un balance energético nulo es generalmente (pero no siempre) benéfico para la salud del organismo ya que un déficit en la energía ingerida (balance energético negativo) genera desnutrición; mientras que un déficit en el gasto calórico o balance energético positivo podría ocasionar obesidad (Bender et al., 1987) y las enfermedades asociadas, tales como diabetes tipo 2.

La conducta alimentaria es un proceso regulado parcialmente por procesos homeostáticos, en los cuales participan muchas regiones cerebrales que son críticas tanto para esta homeostasis como para otros aspectos de la ingesta, tales como la ingesta hedónica, que involucra la motivación (Wise, 2006). En el sistema límbico, neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental que proyectan hacia el núcleo accumbens (NAc), y sus neuronas blanco, se ven implicadas en conductas hedónicas como la preferencia hacia alimentos palatables (Dossat et al., 2013). El NAc se ha asociado a la motivación con la liberación de dopamina como señal de recompensa (Russo et al., 2013).

El gasto energético total de un organismo está constituido por el metabolismo basal (55%-65%), la termogénesis adaptativa (10%) y la actividad física (25%-35%) (Westerterp, 2017, Münzberg et al., 2016). Entre los factores que pueden alterar el gasto energético de un organismo se encuentran la composición corporal y sexo de éste (Webb, 1981), la temperatura ambiental (Leblanc, 1986), la conducta alimentaria (Westerterp, 2010) y la actividad física realizada (Butte et al., 2012). Se sabe que el gasto energético es controlado a nivel central a través de la detección y el procesamiento de señales nerviosas y humorales que promueven respuestas conductuales, neuroendocrinas y autónomas. Entre las respuestas



neuroendocrinas, la actividad del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroideas (HPT) regula la secreción de las hormonas tiroideas (T3 y T4), que incrementan la tasa metabólica basal en todos los tejidos y la termogénesis producida por el tejido pardo adiposo (BAT) (Joseph-Bravo et al., 2015, Fekete et al., 2014).

La capacidad del BAT de ejecutar la termogénesis adaptativa depende de la expresión y actividad de la proteína desacopladora de la cadena respiratoria 1 (UCP1). Las hormonas tiroideas participan en la regulación de la expresión de la UCP1, pero no es la única forma en cómo se puede ver regulada la termogénesis del BAT. A nivel central, el área preóptica hipotalámica (POA) es una de las principales regiones de control de la termogénesis del BAT. En el POA hay una población de neuronas GABAérgicas termo-reguladoras que perciben señales periféricas y centrales de los cambios de temperatura (Nakamura et al., 2008, 2010). Estas neuronas, al recibir señales de un incremento de temperatura, inactivan de forma directa a neuronas simpáticas premotoras de los núcleos del rafe de la medula y de forma indirecta a neuronas en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMN), generando un decremento en la termogénesis del BAT (Yoshida et al., 2009).

Un balance energético nulo es mantenido a través de mecanismos homeostáticos y anticipatorios que generen distintas señales en respuesta a, o anticipando, un cambio en dicho balance. Algunas de estas señales son las hormonas producidas en el tracto digestivo. Por ejemplo, la colecistocinina reduce la ingesta de alimentos a través de los receptores de colecistoquinina 1 (CCK1) que se localizan en el nervio vago; por consiguiente, en ratas nulas (KO) para el receptor de CCK1 se observa un fenotipo de obesidad e hiperfagia (Bi et al., 2002). Otra hormona importante es la ghrelina, la cual es liberada desde el estómago hacia la circulación y es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Durante el ayuno, en sangre y en estómago, se observa un incremento en los niveles de ghrelina y una disminución posterior a la ingesta de alimentos (Kojima et al., 2005). Entre los efectos más conocidos de la ghrelina, se encuentran la estimulación de la motilidad intestinal y la secreción de jugo gástrico (Masuda et al., 2000, Asakawa et al., 2001);

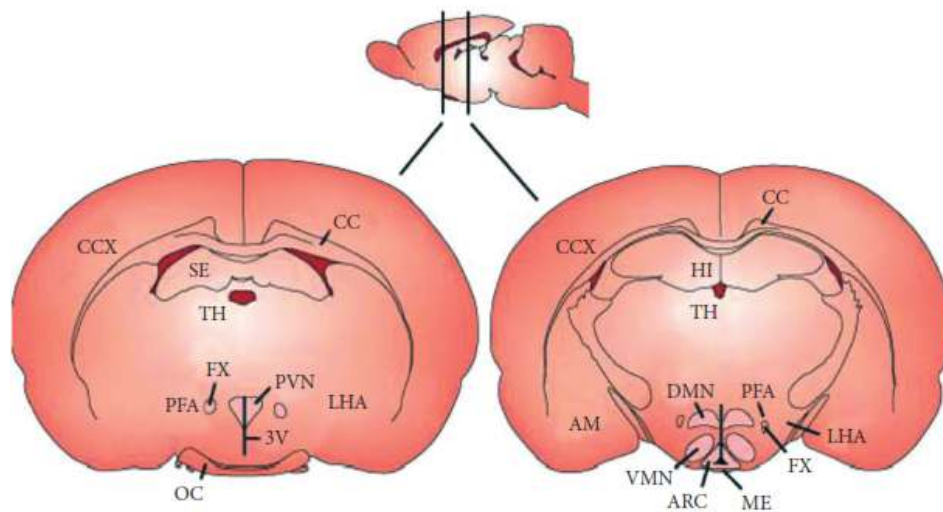
también se ha observado en ratones KO para el gen del receptor de la ghrelina un decremento en la relación de la masa grasa y magra, así como un incremento en el gasto energético en comparación con ratones silvestres (Ma et al., 2011). Por otro lado, el péptido YY (PYY) es sintetizado en las células L intestinales; posterior a la ingesta de alimentos incrementa su liberación hacia la circulación y es disminuida durante el ayuno (Adams et al., 2004). Se ha observado que el PYY tiene un efecto supresor del apetito en humanos y en roedores; así mismo los individuos con niveles bajos de PYY en sangre presentan un fenotipo de obesidad (Karra et al., 2009).

La capacidad de integrar información sobre el estado del balance energético implica al sistema nervioso central y al sistema nervioso periférico. Información sobre las reservas energéticas, la ingesta de alimentos y el nivel de nutrientes es recibida y transmitida por neuronas periféricas hasta el sistema nervioso central, y directamente a través de la irrigación vascular del cerebro (Bauer et al., 2015). En esta tesis el enfoque es hacia los procesos homeostáticos que operan en el hipotálamo, particularmente los que conciernen al núcleo dorsomedial, por lo que la descripción subsecuente se enfoca al papel homeostático de esta región cerebral.

## **1.2 Hipotálamo y balance de energía**

En los primeros estudios que analizaron el papel del sistema nervioso central en el control del balance energético no se tenía muy claro si dicho control residía en la glándula pituitaria o en el hipotálamo. En 1912, Aschner demostró que si removía la glándula pituitaria en perros, dejando intacto el hipotálamo, no se generaba obesidad (Aschner, 1912). Del mismo modo en 1940 Hetherington y Ranson demostraron que a través de lesiones electrolíticas únicamente en el hipotálamo de ratas, en particular en el núcleo ventromedial, se observaba un fenotipo de obesidad causado por un incremento de la grasa y doblando su peso corporal. Estudios posteriores demostraron que lesiones en el hipotálamo lateral también podían ocasionar fenotipos de hipofagia (Grossman et al., 1978, Stricker et al., 1978), por lo cual era claro que la ubicación dentro del hipotálamo de las lesiones era crítica para obtener distintos fenotipos, es decir, distintas partes del hipotálamo podían tener funciones opuestas en la regulación del balance energético.

El hipotálamo se compone de distintos núcleos: arcuato (ARC), dorsomedial (DMN), paraventricular (PVN), preóptico (PO), ventromedial (VMN) y de una región amplia llamada hipotálamo lateral (LH), entre otros (Figura 1). El ARC recibe señales nerviosas y hormonales (leptina, insulina, etc.) procedentes del sistema digestivo y del tejido adiposo, y es un regulador importante de la actividad de los circuitos centrales que determinan el apetito y el gasto de energía (Yu et al., 2012). Esta función del ARC se debe a que contiene neuronas sensoriales de primer orden que reciben directamente señales periféricas sobre el estado energético del organismo.



**Figura 1. Núcleos hipotalámicos en el cerebro de rata**

En esta figura se ilustra la localización del hipotálamo con relación al plano coronal en el cerebro murino; además, se indica la distribución de algunos de los núcleos que lo conforman y son relevantes en la regulación del apetito y gasto de energía. ARC, núcleo arcuato; DMN, núcleo dorsomedial; FX, fórnix; LHA, área lateral del hipotálamo; ME, eminencia media; OC, quiasma óptico; PFA, área perifornical; PVN, núcleo paraventricular; 3V, tercer ventrículo; VMN, núcleo ventromedial. Tomada de Yu et al., 2012.

Entre las neuronas de primer orden del ARC, se encuentran poblaciones de neuronas que expresan el Neuropeptido Y (NPY), la Proteína relacionada a Agouti

(AGRP) y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y otras que expresan Proopiomelanocortina (POMC) y el Transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART); el producto principal del procesamiento de POMC es la hormona estimuladora de melanocitos- $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH). Los neuropéptidos se pueden clasificar como orexigénicos o anorexigénicos, de acuerdo con su efecto positivo o negativo sobre la ingesta de alimento (Zárate et al., 1977). Así entre los péptidos orexigénicos se encuentran el NPY y el AGRP. Inyecciones intracerebroventriculares de estos péptidos en ratones, producen fenotipos de obesidad e hiperfagia. Entre los péptidos anorexigénicos se encuentra la  $\alpha$ -MSH. Ambos tipos de neuronas tienen proyecciones hacia neuronas de segundo orden tales como las que sintetizan la hormona concentradora de la melanina (MCH), CART u orexinas (ORX) ubicadas en el LH (Hervieu, 2006). Los párrafos subsecuentes introducen algunos de los blancos hipotalámicos de las neuronas del ARC involucrados en el balance de energía.

El LH es una región clave para el control del balance de energía. Esta región tiene en particular dos poblaciones celulares fundamentales: las neuronas que producen ORX y las neuronas que producen MCH. Las neuronas que producen las ORX tienen un papel muy importante, ya que inyecciones intracerebroventriculares de estos péptidos en ratones producen fenotipos de obesidad e hiperfagia. Por otro lado, las neuronas que producen la MCH tienen efectos análogos y distintos. Inyecciones intracerebroventriculares de la MCH en ratones producen obesidad e hiperfagia mientras que ratones con una deficiencia del 98% de neuronas MCH presentan un fenotipo delgado e hiperactivo (Whiddon et al., 2013).

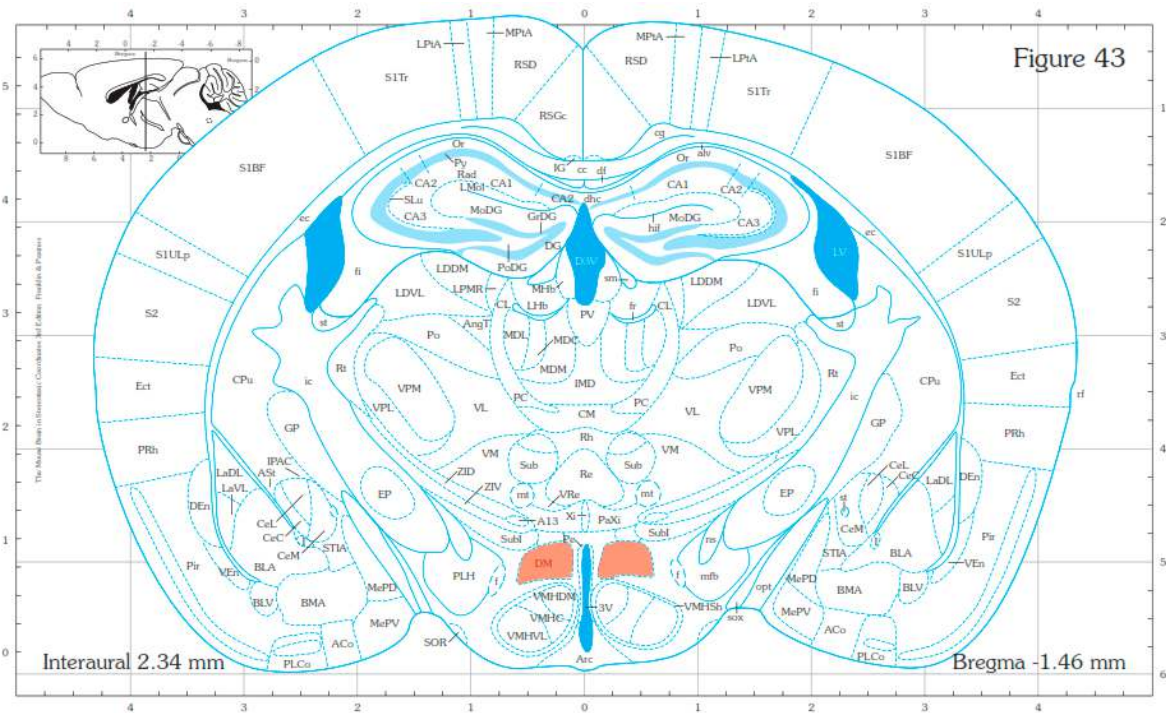
Por otro lado, el PVN es otro núcleo río abajo del ARC, que da lugar a distintas proyecciones que controlan salidas autonómicas y varios ejes endócrinos. Entre éstos, los ejes Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y HPT controlan el gasto de energía y el metabolismo. El eje HPA se activa en respuesta a un estresor físico o psicológico a través de la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en la circulación portal hipotálamo-pituitaria, dando como consecuencia la liberación de corticotropina por la pituitaria, que estimula la secreción de

cortisol/corticosterona desde la glándula adrenal, lo que promueve la gluconeogénesis. Por otro lado, el eje HPT es activado posterior a la ingesta de alimentos a través de la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), lo que ocasiona la liberación de la tirotrópina por la pituitaria, y de las hormonas tiroideas de la tiroides, promoviendo la activación del BAT y la lipólisis. Ambos ejes son autorregulables a través del cortisol/corticosterona y las hormonas tiroideas (Wilson et al., 1998, Hollenberg, 2008).

Otro blanco de las neuronas del ARC es el DMN, donde las neuronas del ARC y de otros núcleos hipotalámicos liberan péptidos y/o neurotransmisores rápidos que regulan el apetito y el gasto energético (Bouret, 2004, Beall et al. 2011).

### **1.3 El núcleo dorsomedial del hipotálamo y el balance de energía**

En ratón, el DMN abarca del bregma -1.46 al bregma -2.18 y está compuesto de una parte dorsal, una compacta y una ventral que van cambiando su distribución a lo largo del eje antero-posterior del núcleo. El DMN recibe proyecciones desde distintas zonas del cerebro como la zona subparaventricular y el núcleo supraquiasmático, las cuales son clave para el control del ciclo circadiano (Chou, 2003); también recibe proyecciones del ARC (Gautron et al., 2010) y del área medial preóptica (Nakamura, 2005). Además de las proyecciones provenientes del ARC, el DMN puede recibir información metabólica directamente, ya que hay células que expresan receptores de leptina y de insulina (Niswender et al., 2004). Por otro lado, el DMN envía proyecciones al VMN, LH, PVN, entre otras zonas que influyen en el balance energético (Horst et al., 1986).



## Figura 2. Núcleo dorsomedial del hipotálamo

Esquema de una rebanada coronal del cerebro de ratón en Bregma -1.46 mm. Se muestra de color anaranjado el DMN. Modificada de Paxinos et al., 2007.

Las primeras evidencias sobre la relación entre DMN y balance energético surgieron a partir de estudios de electroestimulación y lesiones en dicho núcleo. En 1943, Brugger estimuló eléctricamente el DMN de gatos y observó que el animal presentaba una conducta de hiperfagia. Más tarde, en 1970 Bernardis realizó lesiones electrolíticas en el DMN de ratas y observó que los animales presentaban conductas hipofágicas e hipodípsicas en comparación con los animales control; sin embargo, no observó diferencias en la proporción de grasa entre ambos grupos de animales.

Uno de los procesos que implica la conducta alimentaria es el forrajeo, dentro del cual se incluye a la actividad locomotora. En 2016 el grupo de Hu (Lo et al., 2016) observó que someter ratas a ingesta alimentaria restringida a 2 horas durante su periodo de inactividad, generaba un proceso anticipatorio a la ingesta (FAA)

manifestado por un incremento en su actividad locomotora 3 horas antes de que tuvieran acceso al alimento. Observaron que al lesionar el DMN se redujo su (FAA) en comparación con los animales intactos. Esto lleva a pensar que el DMN, dentro de su función de regular el balance energético, puede estar implicado en el forrajeo.

Otros estudios que no dependen de lesiones apoyan la idea que el DMN es importante durante la ingesta de alimento. En un estudio realizado en 2007 por Singru et al., en ratas se observó que después de un ayuno por 3 días, comparado con animales mantenidos en ayuno un periodo de reingesta de 2 horas genera un incremento en el número de células inmunorreactivas para c-Fos (un marcador de actividad neuronal) en distintos núcleos del hipotálamo, entre ellos el DMN.

En el DMN existen poblaciones de neuronas con diversos perfiles fenotípicos que presentan una respuesta a un cambio en el balance energético. Así, se ha detectado en ratones que posterior a un ayuno nocturno, se incrementa la actividad de neuronas colinérgicas en el DMN en comparación con un grupo control (Groessl et al., 2013).

En 2019, el grupo de Kokare (Nakhate et al., 2019) observó que inyecciones repetidas de insulina intracerebroventricular (i.c.v.) por 7 días disminuye significativamente la ingesta de alimento en ratas. También pudieron observar a través de inmunohistoquímica que, a consecuencia de las inyecciones de insulina, se incrementa la cantidad de CART en distintos núcleos hipotalámicos, entre ellos el DMN. Estos datos sugieren que algunos de los efectos anorexigénicos de la insulina pudieran ser mediados por las neuronas de CART del DMN, ya que el CART tiene efectos anorexigénicos.

En el DMN de la rata también hay neuronas que producen uno de los péptidos de la familia Arg-Phe-amida (RFRP), péptido que tiene actividad anorexigénica cuando se inyecta en el hipotálamo. Las neuronas del DMN que sintetizan RFRP también producen GABA y proyectan hacia el núcleo supraquiasmático, inhibiendo así a neuronas de este núcleo en un periodo de pre-ingesta en el modelo de ingesta alimentaria restringida (el acceso a alimento se restringe a ciertas horas del día), y disminuyendo la actividad de este núcleo durante el periodo de descanso. Esto

puede explicar el incremento de la conducta locomotora de los animales en una situación previa a la ingesta de alimentos (Acosta-Galvan et al., 2010).

Además, existe una población de neuronas del DMN expresa al NPY (White et al., 1990). La sobre-expresión del NPY en el DMN a través de la inyección de un vector viral incrementa la ingesta y el peso corporal en ratas delgadas mientras que en ratas genéticamente obesas la reducción de la expresión de NPY en el DMN reduce la hiperfagia y obesidad (Yang et al., 2009).

Finalmente, evidencia funcional reciente demuestra claramente que hay neuronas del DMN críticas para la ingesta. El grupo de Xu (Liao et al., 2019) demostró que en el DMN existe una población de neuronas que expresan el TrkB, un receptor del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), en ratones y cuya activación quimiogénica reduce la ingesta de alimento durante el periodo de actividad del animal. Así mismo, observaron que inhibiendo las neuronas que expresan TrkB durante el periodo de inactividad del animal, se incrementaba la ingesta de alimento. Finalmente, cuando inhibieron a las neuronas que expresan TrkB durante el periodo de actividad del animal, no observaron cambios en la ingesta de alimento. Por lo cual concluyeron que las neuronas del DMN que expresan TrkB se encuentran completamente inhibidas durante el periodo de actividad del animal; también concluyeron que las neuronas del DMN que expresan TrkB son necesarias y suficientes para controlar la ingesta de alimentos.

## **2. Antecedentes**

La TRH es un neuropéptido compuesto de tres aminoácidos (p-glu-his-pro-NH<sub>2</sub>) que al ser liberado de terminales de la eminencia media de hipotálamo al sistema portal hipofisiario, estimula la secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), participando así en la regulación de los niveles de hormonas tiroideas, y por lo tanto del metabolismo basal y la termogénesis (Joseph-Bravo et al., 2015). Dentro del hipotálamo, se han encontrado diversas zonas que contienen poblaciones de neuronas TRHérgicas; entre ellas figuran las del DMN, zonas no hipofisiotrópicas del PVN, del área media preóptica (MPA), del hipotálamo anterior (AH) y del LH. La mayoría del conocimiento que se tiene sobre las neuronas de TRH



se enfoca a la población hipofisiotrófica que reside en el PVN (Lechan et al., 2006). Las diversas poblaciones adicionales de neuronas TRHérgicas hipotalámicas tienen una función desconocida, pero existe evidencia anatómica y bioquímica que sugiere que actúa sobre blancos intrahipotalámicos. La TRH actúa a través de receptores de TRH acoplados a proteínas  $G_q$  (TRH-R1 y TRH-R2) (Sun, 2003). Estos receptores se encuentran sobre la superficie de las células en distintos tejidos, entre ellos varios núcleos hipotalámicos (LH, DMN, PVN, etc.), siendo ahí de predominancia el TRH-R1 (O'Dowd et al., 2000). Ambos receptores tienen la misma afinidad por la TRH (O'Dowd et al., 2000); una vez activados por el ligando, ambos incrementan la concentración de calcio intracelular y activan procesos membranales (regulación de canales de potasio), citosólicos y nucleares (Curran et al., 1988, Jefferson et al., 1991).

Se han descubierto distintas funciones neuromoduladoras de la TRH adicionales al control del eje HPT. En el cerebro, la TRH participa en la regulación de diversos procesos como la termorregulación, glucohomeostasis, la respiración, la actividad locomotora y la ingesta de alimentos (Nillni et al., 1999, Joseph-Bravo et al., 2015). Por ejemplo, la inyección de TRH por vía i.c.v. en rata inhibe la ingesta de alimento y líquido durante 1 hora posterior a su administración; dicha disminución de la ingesta es dependiente de la dosis de TRH administrada (Gotoh et al., 2007). Existen varias hipótesis sobre la naturaleza de las neuronas TRHérgicas que pudieran estar involucradas en el efecto anoréxico; se mencionan a continuación.

Se ha demostrado que inyectando TRH en el núcleo accumbens de ratas sometidas a restricción alimentaria, las cuales ingieren 50% menos comida que el grupo control *ad libitum* y a un ayuno de 48 horas se disminuye la cantidad de alimento ingerido comparado con el grupo al que le inyectaron solución salina. Este estudio sugiere que la TRH podría regular la motivación que conlleva dicha conducta (Puga et al., 2016). El origen de las neuronas implicadas en este efecto es desconocido. Otros antecedentes sugieren que los efectos de la TRH sobre la ingesta se asocian en parte a la existencia de los grupos de neuronas TRHérgicas localizadas en el hipotálamo.

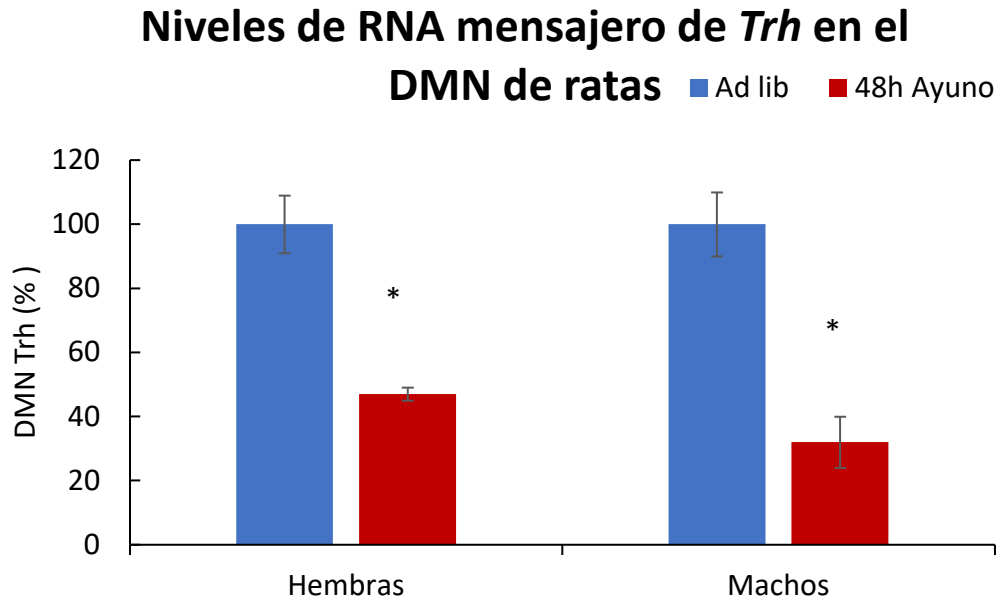
Péterfi et al., en 2018, demostraron que en el lecho del núcleo de la estría terminal (BNST) y en el área perifornical del hipotálamo hay una población de neuronas TRHérgicas que co-expresan urocortina 3 (UCN3) y que proyectan hacia una población de neuronas POMC del ARC. Esto sugiere que el grupo de neuronas del TRH/UCN3 del BNST podría tener algún papel en la regulación de la ingesta de alimentos. Sin embargo, sus estudios por “patch clamp” señalan que si bien UCN3 tiene un efecto directo excitatorio sobre las neuronas de POMC del ARC (lo que pudiera generar una respuesta anorexigénica), el TRH suprime estos efectos posiblemente de forma indirecta.

Por otro lado, Horjales-Araujo et al., en 2014, mostraron a través de inmunohistoquímica que en el LH existe una población de neuronas de TRH que recibe proyecciones desde neuronas  $\alpha$ -MSH y AGRP del ARC. Esto sugiere que una población de neuronas TRHérgicas del LH está relacionada al balance energético mediante la modulación por el ARC. Sin embargo, no se conocen las proyecciones de estas neuronas hacia otras neuronas hipotalámicas, ni su papel funcional.

Heuer et al., 2000 mostraron a través de hibridación *in situ* que el RNA mensajero del TRH se expresa de manera abundante en el DMN, en la rata. Sus resultados confirmaron resultados previos que indicaban que el núcleo dorsomedial contiene una importante población de neuronas TRHérgicas detectadas por inmunohistoquímica (Lechan and Jackson, 1982), cuyo papel todavía se desconoce. Esto coincide con otros estudios que confirman la presencia de neuronas TRHérgicas en el DMN de ratón (Zhang et al., 2012).

En el laboratorio de los Drs. Joseph y Charli se ha observado que la expresión de la TRH de ratas macho adultas Wistar disminuye en el DMN tras la restricción alimentaria moderada por 14 días (Uribe et al., 2014), y que en ratas hembra o macho un ayuno de 48 horas provoca la disminución notable del mensajero de *Trh* del DMN (Jaimes-Hoy et al., no publicado, figura 3). Por otro lado, en ratas Otsuka Long-Evens Tokushima Fatty (OLETF) que se vuelven hiperfágicas y obesas en condiciones sedentarias, la expresión de *Trh* en el DMN se encuentra disminuida

comparado a animales delgados (LETO). En ratas OLEFT el ayuno incrementa la expresión de *Trh* en DMN, contrario al observado en ratas Wistar (Zhang et al., 2019). Estos datos sugieren que las neuronas TRHérgicas del DMN pueden tener alguna función relacionada con el mantenimiento del balance energético.



**Figura 3. Efecto del ayuno sobre los niveles de mensajero de *Trh* en el DMN en ratas Wistar adultas.**

Posterior al experimento, se obtuvo una rebanada coronal de cerebro congelado cortada a nivel del DMN y con un sacabocado de diámetro de 0.5 mm colocado sobre el DMN se obtuvo el tejido; se purificó ARN total y finalmente se hizo un análisis de RT-PCR semi-cuantitativo utilizando como control interno. Los datos son la media  $\pm$  el error estándar (n=6). En azul se muestran los grupos control que tuvieron comida *ad libitum* y en rojo los grupos que tuvieron un ayuno de 48 h. Se observa que hay una disminución de los niveles del mensajero de *Trh* en el DMN en los grupos ayunados en comparación con los grupos control. Análisis por test de t, \*:  $p < 0.02$ . Información compartida por la Dra. L. Jaimes-Hoy.

### **3. Justificación**

En los últimos 50 años se han triplicado los casos de obesidad a nivel mundial, lo cual produce una disminución en la calidad de vida por las diversas patologías que conlleva dicha condición. Ya que la obesidad es un problema relacionado a la desregulación del balance energético, resulta importante conocer a fondo los mecanismos que lo controlan, tanto para entender mejor la fisiología de los circuitos de control del peso corporal, como para tener nuevas herramientas para tratar el problema. El DMN juega un papel muy importante en el control del balance energético. En particular existen evidencias que sugieren que las neuronas TRHérgicas en el DMN son importantes en el control del balance energético. Con la finalidad de obtener mayores pistas acerca del papel que tienen las neuronas TRHérgicas en el control del balance energético, en esta tesis se analizó el estado funcional de las neuronas del DMN en ratones adultos sometidos a ayuno y reingesta, como un paso preliminar a un estudio más profundo de estas neuronas en el ratón. Al estudiar dichas neuronas en el contexto de variaciones del balance energético, se entenderá mejor su relación con el control central del balance energético.

### **4. Hipótesis**

Proponemos que en el núcleo dorsomedial hipotalámico de ratones macho existe una población de neuronas TRHérgicas sensibles a cambios en el balance energético. Debido a que la TRH es un péptido anorexígeno, se propone que la actividad de estas neuronas sea inhibida en condiciones de balance energético negativo e incrementada en respuesta al balance energético positivo.

### **5. Objetivo general**

Determinar si las neuronas TRHérgicas en el núcleo dorsomedial hipotalámico son sensibles a cambios en el balance energético en el ratón macho adulto de la cepa C57BL6/NJ.

## 6. Objetivos particulares

- Observar por inmunohistoquímica de c-Fos si existe cambio en el estado funcional de células en el DMN en respuesta a un ayuno de 24 h y a la reingesta por 3 h posterior a un ayuno de 21 h en comparación con ratones con alimentación *ad libitum*.
- Cuantificar por hibridación *in situ* el número de células del DMN que expresan el mensajero de *Trh* en animales alimentados *ad libitum*, ayunados por 24 h o con reingesta por 3 h después de un periodo de ayuno de 21 h.
- Cuantificar el grado de colocación de cFos y del RNAm de *Trh* en el DMN en animales con diferente balance energético.

## 7. Materiales y métodos

La metodología descrita a continuación se basó en las siguientes fuentes:

Uribe et al. 2014, De Gortari et al. 2006, Sánchez et al. 2001, Kádár et al. 2010, Fekete et al. 2001 y Guerrero-Castro et al. 2018

### 7.1 Animales

En este trabajo empleamos ratones macho C57BL6/JN (The Jackson Laboratory) de de entre 8 a 10 semanas de edad, los cuales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los animales se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (la luz se prende a las 7AM) y temperatura controlada de 19 a 23 °C. Los animales fueron separados en 3 grupos experimentales, cada grupo se mantuvo en una caja. Las condiciones de cada grupo fueron las siguientes:

- Grupo *ad libitum*: Este grupo contó con agua y comida *ad libitum*.
- Grupo ayunado: En este grupo los animales pasaron por un ayuno de 24 h. El ayuno se inició a partir de las 10 AM. Los animales en todo momento tuvieron agua *ad libitum*.

- Grupo con reingesta: Este grupo se mantuvo en condiciones de ayuno por 21 h. Posteriormente se les regresó el alimento *ad libitum* por un periodo de 3 h. Los animales en todo momento tuvieron agua *ad libitum*.

Se reportan los resultados de 2 experimentos. Sin embargo, previo a los experimentos, se estandarizaron las condiciones de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* con animales que no fueron sometidos a ningún experimento. En el experimento # 1 se realizó únicamente la inmunohistoquímica contra c-Fos; el grupo *ad libitum* contó con 1 animal, el grupo ayunado con 4 animales y el grupo reingesta con 4 animales. En el experimento (# 2) donde se realizó la hibridación *in situ* para el mensajero de TRH y la inmunohistoquímica para c-Fos, cada grupo contó con 3 animales. Todos los animales fueron pesados antes y después de iniciar el periodo de ayuno y posterior a la reintroducción del alimento. El alimento consumido durante las 3 h fue cuantificado. Una vez terminado el procedimiento experimental descrito anteriormente, se procedió al sacrificio.

## **7.2 Sacrificio de los ratones por perfusión**

Es importante mencionar que todo el material y los reactivos que estuvieron en contacto con los tejidos estaban libres de RNAsas. Todos los animales fueron anestesiados con 200 mg/Kg de pentobarbital sódico (marca Pisa) por vía intraperitoneal en posición de Trendelenburg. Una vez profundamente anestesiado el animal, se abrió la cavidad abdominal y se pasó un catéter sin filo por el ventrículo cardiaco izquierdo del animal y se hizo una incisión en la aurícula derecha. Posteriormente se perfundió cada ratón con 20 mL de solución de PBS 1X (para PBS 10X: NaCl 1.36 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM y KCl 26.8 mM) con 15000 U/L de heparina. Inmediatamente después y teniendo cuidado de no introducir aire en las mangueras de perfusión, se continuó con 60 mL de paraformaldehído al 4% en PBS 1X. Una vez concluida la perfusión, se decapitó al animal y se extrajo cuidadosamente el cerebro. Los cerebros se almacenaron en un vial estéril con paraformaldehído al 4% en PBS 1X frío en hielo.

## **7.3 Criopreservación de cerebros**

Una vez extraídos los cerebros, se almacenaron en paraformaldehído 4% en PBS 1X a 4 °C por 4 horas. Posteriormente, los cerebros se cambiaron a una

solución de criopreservación (sacarosa al 20% en PBS 1X) overnight a 4°C. Pasado el tiempo de incubación con sacarosa, se extrajeron los cerebros de los viales y se congelaron rápidamente con hielo seco pulverizado. Luego se almacenaron a -70 °C cubiertos en un Parafilm y envueltos en papel aluminio rotulado.

#### **7.4 Sección de los cerebros en rebanadas coronales**

Todos los cerebros crioprotectados fueron mantenidos a -70 °C; por lo tanto, fue necesario sacarlos en una charola con hielo seco y colocarlos por una hora en la cámara del criostato (HM52SNX Thermo Scientific) para que se equilibrara su temperatura con la de la cámara del criostato, que debe estar de -16 a -18 °C. Posteriormente, se rebanó a mano con una navaja sobre el cerebelo en un plano coronal para poder crear una base que estuvo en contacto con la platina. Luego se pegó el cerebro a la platina con un líquido de montaje (Tissue-tek OCT compound Sakura Finetek 4583), se esperó a que se endureciera dejándolo dentro de la cámara del criostato en contacto con hielo seco. Se sujetó bien la platina dentro del criostato para comenzar a rebanar. Se comenzaron a hacer rebanadas de 20 µm y conforme se iba avanzando en los cortes, se recolectaron algunas rebanadas y se realizó una tinción con azul de toluidina al 1% y agua para observar estructuras del cerebro en un microscopio estereoscópico (Olympus Tokyo 286589) con una fuente de luz (Fiber Lite Mi-15 Dolan Jenner Industries) y poder alinear el corte con base a lo reportado en el atlas del cerebro de ratón (Paxinos, 2007). La platina pudo moverse en varias direcciones y se trató de colocar el cerebro lo más ortogonal posible al plano sagital. Una vez localizada la región dentro del cerebro para iniciar la recolección de rebanadas (en este protocolo al nivel del bregma -1.22 mm, previo al DMN), se colectaron las rebanadas en PBS 1X, o en buffer anticongelante [20% H<sub>2</sub>O, 30% Etilenglicol, 25% Glicerol y 25% Buffer fosfatos 0.2M pH 7.4] si no se usaron inmediatamente. Con un pincel se recolectaron las rebanadas en cuatro series (Se colocó el primer corte en la serie 1, y el corte consecutivo se colocó en la serie 2, y así sucesivamente hasta la serie 4, luego se regresó la recolección a la serie 1 y se continúa a la serie 2...) hasta llegar al bregma -2.18 mm. Posteriormente, las rebanadas recolectadas en PBS se montaron inmediatamente en portaobjetos

cargados (+) (Thermo Scientific Superfrost) y las recolectadas en anticongelante se guardaron a -20 °C.

### **7.5 Montaje de rebanadas de cerebro en laminillas cargadas**

Durante el montaje de las rebanadas fue necesario mantener condiciones libres de RNAsas. Las rebanadas que fueron guardadas en buffer anticongelante fueron lavadas 3 veces con PBS 1X en agitación a TA por 5 minutos. Una caja Petri, se llenó completamente con PBS 1X y se fueron colocando las rebanas para pegarse en las laminillas cargadas. Se rotuló la laminilla (para identificar el número de serie y el orden de las rebanadas) con un lápiz de grafito puro. Posteriormente con ayuda de un pincel o dos, se colocaron con toda la delicadeza del mundo las rebanadas bien extendidas en la parte cargada (+) de la laminilla y se sacó poco a poco la laminilla del PBS 1X. Si se consideró necesario, se utilizó un estereoscopio y una fuente de luz para tener una mayor precisión en el pegado de las rebanadas. Se dejaron secar las laminillas y se guardaron a -70 °C hasta su procesamiento por inmunohistoquímica e hibridación *in situ*.

### **7.6 Obtención de células competentes<sup>1</sup>**

Para la amplificación del vector de transcripción *in vitro* del ARNm de *Trh* de ratón (plásmido pGEM-T; Kádár et al., 2010) donado amablemente por el Dr. Csaba Fekete fue necesario preparar células competentes. Se partió de una cepa guardada en glicerol de células *Escherichia coli* DH5α guardado a -70 °C. Se estriaron las células en una caja Petri con medio Luria-Bertani (LB) sólido estéril [Peptona 10 g, NaCl 10 g, Extracto de levadura 5 g, Agar 15 g para 1 L de agua, ajustar pH 7.0 con NaOH] y se dejaron crecer toda la noche a 37 °C. En un matraz de 125 mL con 5 mL de LB líquido se inoculó a partir de una colonia del cultivo sólido, se incubó a 37 °C en agitación, hasta que alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.4 – 0.5 a 600 nm (medido en un espectrofotómetro 6305 UV-Vis Jenway). Posteriormente, en un matraz de 1L se inocularon 100 mL de medio LB (precalentado a 37 °C) con el cultivo previamente mencionado, se incubó a 37 °C en agitación hasta que alcanzó una D.O. de 0.45 a 600 nm. Una vez alcanzada la

---

<sup>1</sup> Para trabajar con cultivos de células, se trabaja en condiciones estériles (campana de flujo laminar) y con material estéril.



densidad adecuada, el medio de cultivo en el matraz fue colocado sobre hielo por 5 minutos y se recolectaron las células por centrifugación (6 000 rpm por 5 minutos a 4 °C) en tubos Falcon de 50 mL previamente enfriados en hielo. Se resuspendió la pastilla de células en 20 mL de 60 mM de CaCl<sub>2</sub>, 15% de glicerol previamente enfriado en hielo. A continuación, se pusieron los tubos en una gradilla adecuada para dejar incubando en hielo toda la noche. Una vez pasada la incubación en hielo, se retiró con mucho cuidado el sobrenadante y se dejan únicamente de 2 a 4 mL de volumen. El volumen remanente se almacenó a -80 °C en alícuotas de 100 µL en tubos de 1.5 mL previamente enfriados a 4 °C.

### **7.7 Transformación de células competentes**

Se descongelaron en hielo las células competentes por 5 minutos. Se añadieron 10 µL (300 ng/µL) de plásmido pGEM-T con el inserto de DNA complementario al ARN mensajero de *Trh* de ratón (Kádár et al., 2010) al tubo con las células competentes. Se incubaron en hielo por 30 minutos e inmediatamente se sometió a un choque térmico de 42 °C por 42 segundos en un termoblock Eppendorf Thermomixer R 5355. Se enfrió con hielo durante 2 minutos y se añadieron 900 µL de medio LB (precalentado a 37 °C). Se incubó en agitación 1 hora a 37 °C. 100 µL de las células se distribuyeron sobre las placas Petri con LB con Carbenicilina/Ampicilina 100 µg/mL (final) y se plaqueó con perlas o con un asa de vidrio. El remanente de células se centrifugó a 4 000 rpm por 4 minutos, se desechó el sobrenadante y el resto de las células se resuspendió con medio y se plaqueó como concentrado. Se incubó toda la noche a 37 °C en una incubadora Thermo Scientific 50125590.

### **7.8 Criopreservación de células transformadas**

Con un palillo de madera estéril, se picó una colonia transformada y se inoculó un tubo con 10 mL de LB con antibiótico Carbenicilina/Ampicilina 100 µg/mL (final) y se dejó en crecimiento toda la noche (ON) a 37° C con agitación. Se recolectaron las bacterias por centrifugación a 4 000 rpm 10 min en un tubo de 15 mL. Se decantó el sobrenadante lo mejor posible y se resuspendió la pastilla en 1 mL de medio LB sin antibiótico. Posteriormente se agregaron 500 µL de glicerol al

75% (diluido en agua) y se mezcló bien. Se pasó el contenido a un vial de plástico con taparrosca, se rotuló el vial y se guardó a -80 °C.

### **7.9 Extracción del plásmido pGEM-T con el inserto de TRH**

Se partió de un cultivo de 4 mL de *E. coli* con el plásmido pGEM-T con el inserto de *Trh*. Este cultivo se incubó toda la noche a 37 °C en agitación y se extrajo el plásmido de acuerdo al método Miraprep (Pronobis et al, 2016) con el kit Miniprep GeneJET. A continuación, se explica brevemente la metodología.

Se recuperaron las células en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL por centrifugación a 13 300 rpm por 2 minutos. Luego se resuspendió la pastilla en solución de resuspensión con RNAsa fresca (50 µg/ml), luego se agregó la solución de lisis y después se agregó la solución de neutralización y se centrifugó a 13 000 rpm por 5 minutos. Se pasó la fase líquida a un tubo nuevo y se agregó un volumen de etanol y se mezcló con pipeta. Se pasó el contenido a una columna del kit y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm. Se agregaron 500 µL de la solución de lavado y se centrifugó por 1 min a 13 000 rpm. Se repitió el lavado una vez más. Se centrifugó el tubo para eliminar los remanentes de la solución de lavado por 1 min a 13 000 rpm. Se transfirió la columna a un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL y se agregaron 50 µL del buffer de elución y se incubó por 2 min a TA. Finalmente se recuperó el plásmido, centrifugando por 2 min a 13 000 rpm.

### **7.10 Cuantificación de ácidos nucleicos**

Para cuantificar el plásmido circular o linearizado, así como sondas de RNA, se utilizó un espectrómetro NanoDrop (2000c Thermo Scientific). Se realizó el blanco con agua desionizada y se eligió el tipo de ácido nucleico que se desea medir. Es importante que después de que se use el equipo, se debe limpiar con agua y volver a medir la absorbancia del agua para comprobar la limpieza de éste.

### **7.11 Electroforesis en agarosa para DNA**

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (Tris Base 890 mM, ácido bórico 890 mM y 20 mM de EDTA pH 8). Fue necesario calentar el TBE 1X en el microondas para que la agarosa pudiera solvatare. Se colocó la agarosa líquida no tan caliente dentro de un molde y se puso un peine para formar pozos y se esperó a que solidificara. Se colocó el gel de agarosa en una cámara de

electroforesis con suficiente buffer TBE 0.5X como para cubrir totalmente al gel. Para preparar las muestras que se sometieron a electroforesis, se mezclaron de 2 a 5  $\mu\text{L}$  (aprox. 500 ng) de la muestra, 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga [0.25% bromofenol azul, 0.25% xileno cianol FF y 40% sacarosa en agua desionizada] y se aforó a 10  $\mu\text{L}$  con agua mili Q. Se colocaron las muestras en los pozos del gel. Se colocó un marcador de pares de bases (marcador IV de DNA de Sigma-Aldrich para plásmidos y 100 bp de NEB) en alguno de los pozos del gel. Se conectó la cámara de electroforesis a una fuente de poder y se aplicaron 10 V por cada centímetro de longitud del carril por 1h [Se prestó atención en que la ubicación del cátodo (cable negro) fuera proximal a los pozos y la ubicación del ánodo (cable rojo) fuera distal a los pozos ya que los ácidos nucleicos tienen carga negativa]. Para visualizar las bandas de DNA, se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio (0.0003 mg/mL) durante 10 min y luego se hicieron de 1 a 2 enjuagues en  $\text{dH}_2\text{O}$  de 20 min. Los desechos de lavado fueron colocados en un garrafón destinado para eso. Luego se observó el gel en un fotodocumentador (Gel Molecular Imager Doc XR+ Bio Rad) y se tomó una foto. El gel se desechó en una bolsa especial para desechos sólidos de bromuro de etidio.

### **7.12 Linearización del plásmido pGEM con el inserto de *Trh***

En un tubo para microcentrifuga de 500  $\mu\text{L}$  se agregaron 20  $\mu\text{g}$  de plásmido y 5  $\mu\text{L}$  de buffer NEB Cut Smart. Se mezcló bien la solución con pipeta y se aforó a 49  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ. Una vez mezclado todo, se agregaron 10 unidades de la enzima NcoI (para sonda antisentido) o de la enzima SpeI (para la sonda sentido) y se mezcló cuidadosamente invirtiendo el tubo. Se incubó la reacción a 37 °C por 3 horas en una incubadora Thermo Scientific 50125590 o en un termoblock. Para purificar el plásmido linearizado se ocupó el kit High Pure PCR Product Purification de Roche. Dicho kit consistió en llevar el volumen de la reacción a 100  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  miliQ y se mezcló con Binding Buffer, posteriormente se pasó la reacción a través de columnas y se centrifugó; se hicieron 2 lavados a la columna, finalmente se eluyó con el buffer de elución. Una vez purificado el plásmido linearizado, se cuantificó en el NanoDrop y se visualizó en un gel de agarosa.

### **7.13 Síntesis de las sondas de RNA sentido y antisentido contra el mensajero de *Trh* marcadas con digoxigenina**

En un tubo para microcentrifuga de 500  $\mu$ L se colocó 1  $\mu$ g de plásmido linearizado desnaturalizado por 5 min a 65 °C (para sonda sentido o antisentido), 2  $\mu$ L de DTT 100 mM, 3  $\mu$ L de una mezcla de nucleótidos CTP, GTP y ATP 10 mM, 1  $\mu$ L de UTP 2 mM, 1  $\mu$ L de Digoxigenina-11-UTP 3.5 mM (Sigma), Buffer de transcripción 1X final, 1  $\mu$ L de Inhibidor de RNAsas 40 U/  $\mu$ L (Sigma), se aforó a 18  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O mili Q y se adicionaron 2  $\mu$ L de RNA polimerasa 20 U/ $\mu$ L (para sonda antisentido RNA polimerasa SP6 de Roche / para sonda sentido RNA polimerasa T7 de NEB). Se mezcló sin pipetear e incubó en un termoblock o en baño María a 37 °C por 1 h. Luego se agregó 1  $\mu$ L de RNA polimerasa, se mezcló bien y se continuó con la incubación por 1h. Posteriormente se adicionó 1  $\mu$ L de DNAsa libre de RNAsa 10 U/ $\mu$ L y 0.5  $\mu$ L de inhibidor de RNAsa, se mezcló bien y se continuó la incubación por 45 min. Para detener la reacción se agregaron 80  $\mu$ L de DTT 20 mM, 10  $\mu$ L de NaCl 4 M y 330  $\mu$ L de etanol absoluto frío, se mezcló bien y se dejó precipitando por al menos 2 h a -70 °C. Se centrifugó a 13 500 rpm a 4 °C por 30 min, se decantó el sobrenadante con mucho cuidado dejando la pastilla de RNA en el fondo. Se lavó la pastilla con etanol al 75% y se centrifugó a 13 500 rpm a 4 °C por 15 min. Se decantó el etanol y se dejó secando la pastilla. Se resuspendió la pastilla en 50  $\mu$ L de agua libre de RNAsa y 0.02% de SDS. Se cuantificó el producto en el NanoDrop.

### **7.14 Caracterización del transcrito por electroforesis en agarosa**

En tubos para microcentrifuga de 0.5 mL se agregaron de 1 a 2  $\mu$ L de los transcritos (aprox. 300 ng) + 6  $\mu$ L de formamida ultrapura desionizada + 2  $\mu$ L de buffer de carga + agua libre de RNAsa para ajustar a 10  $\mu$ L y se calentaron por 5 min a 65 °C. Posteriormente se incubaron en hielo por 5 min. Las muestras fueron cargadas en el gel de agarosa exactamente como se hace en una electroforesis de DNA y se continuó el procedimiento hasta visualizar las muestras en un fotodocumentador.

### **7.15 Determinación de la incorporación de digoxigenina al transcrito por “dot blot”**

En una membrana de Nytran (Schleicher & Schuell) se colocó 1  $\mu$ L de la sonda marcada con digoxigenina y a un lado se colocó 1  $\mu$ L de un control positivo (RNA control marcado con digoxigenina 100ng/ $\mu$ L, Roche). Se dejó secar la membrana y después se fijó el RNA a la membrana empleando un Stratalinker. Se aplicaron 3 ciclos de crosslinking con luz UV. Una vez fijadas las muestras a la membrana, ésta se sumergió en Buffer B (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris HCl 100 mM pH 9.5) 5 min, luego se bloqueó con una solución de 4% Blocking Reagent (Sigma 11096176001) por 10 minutos, después se retiró la solución y se incubó con anticuerpo antidigoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (1:5000) durante 5 minutos y se enjuagó en buffer B por 5 min. Finalmente, en la oscuridad se hizo el revelado con el sustrato de la fosfatasa alcalina 4 nitroblue tetrazolium cloruro y 5 bromo - 4 - chloro - 3 indolyl fosfato (NBT/BCIP) 0.45 mg/mL y 0.175 mg/mL respectivamente (Sigma) aproximadamente 10 min. Se detuvo la reacción con Buffer A (NaCl 100 mM y TrisHCl 100 mM pH 7.6).

### **7.16 Inmunohistoquímica contra c-Fos<sup>2</sup>**

Se sacaron las laminillas del ultracongelador y se secaron con una pistola de aire a temperatura media y velocidad media. Posteriormente, se fijaron los tejidos en paraformaldehído 4% en PBS 1X 5 min. Se inactivó la peroxidasa endógena, incubando en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.1% (v/v) en PBS 1X por 10 min. Se hicieron 3 lavados en PBS 1X por 5 min o hasta la eliminación de las burbujas. Se permeabilizaron los tejidos con Tritón X-100 al 0.3% (v/v) en PBS 1X por 20 min. Se realizó un bloqueo con BSA al 2%, Tritón X-100 al 0.2% (v/v) en PBS 1X de 90 a 120 min. Posteriormente se incubaron los tejidos con el anticuerpo primario anti c-Fos (SC-52)<sup>3</sup> hecho en conejo 1:300 diluido BSA al 1% con Tritón X-100 al 0.1% (v/v) en PBS 1X a 4°C durante 36 h. Transcurrido este tiempo se atemperan los tejidos a TA y se hicieron 3 lavados en PBS 1X por 5 min c/u. Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado realizado en chivo (Vector Labs

---

<sup>2</sup> Para tener un control negativo, únicamente no se agrega el anticuerpo primario.

<sup>3</sup> Santa Cruz Biotechnology, INC demuestra la especificidad del anticuerpo a través de un control negativo (células 293T: sc-117752) y con un control positivo (células transfectadas con c-Fos 293T: sc-118888)

BA-1000) diluido 1:200 en BSA al 1% con Tritón X-100 al 0.2% (v/v) en PBS 1X durante 2 h a TA. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X de 5 min y se procedió a la incubación con el reactivo ABC (Reactivo de ABC kit Elite Vestatatin PK6100) diluido 1:50 en PBS 1X durante 45 minutos a TA preparado 20 min antes. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS 1X por 5 min. Para la realización del revelado se preparó el volumen necesario para el número de laminillas a revelar de la solución de revelado (0.25% de 3,3-Diaminobencidina DAB, 0.036% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Tris HCl 0.05 M pH 7.6) y se filtró usando un filtro de poro 0.45 µm, se enfrió e inmediatamente antes de emplearla se agregó 0.036% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El revelado se realizó por incubación de las rebanadas en la solución de revelado en ausencia luz por aproximadamente 7 min y se detuvo la reacción con 3 lavados en Tris HCl 0.05M pH 7.6 o con PBS 1X. La señal positiva para c-Fos correspondió a un precipitado café sobre el núcleo. Si no fue posible continuar con la hibridación *in situ*, los tejidos se deshidrataron a través de etanol en concentraciones crecientes (70%, 80%, 95%, 100% preparados en condiciones libres de RNAsas), se permitió que los tejidos se secan a TA y se guardaron a -70 °C.

#### **7.17 Hibridación *in situ* contra el mensajero de *Trh***

Se sacaron las laminillas del ultracongelador y se secaron con una pistola de aire a temperatura y velocidad media. Se fijaron los tejidos en paraformaldehído 4% en PBS 1X. Posteriormente se hizo un lavado en PBS 1X de 5 min y se permeabilizó por 30 min en 0.3% Triton X-100 en PBS 1X. Nuevamente se lavaron en PBS 1X por 5 min y se hizo una incubación a 37° C con agitación por 30 min con Proteinasa K 1 µg/ml diluida en EDTA 0.05 M con Tris 0.1 M pH8.0. Se lava 1 vez en PBS 1X. Transcurrido el tiempo, se hizo un lavado por 10 min en PBS 1X, se acetilaron [preparar al momento SSC 4Xfinal + 0.1 M de trietanolamina + 0.25%de ácido acético anhídrido pH final de 8.0] las rebanadas por 10 min, luego se hizo un lavado por 5 min en SSC 2X [NaCl 0.3 M y citrato de sodio 0.03 M] y se deshidrataron por 2 min en alcohol con concentraciones crecientes 75%, 80%, 95% y 100%. Subsiguientemente se deslipidaron las rebanadas en cloroformo puro por 5 min y se realizaron lavados en EtOH 100% y 95% de 2 min c/u. Los tejidos se dejaron secando al aire a TA. Para la hibridación, los tejidos fueron cubiertos con 70 µL de

buffer de hibridación [500  $\mu$ L: SSC 20X 50  $\mu$ L, 20% dextran sulfato en formamida desionizada ultra pura 250  $\mu$ L, 10% sarcosyl en buffer fosfatos 1 M (pH 7.4) 50  $\mu$ L, Denharts 100X 5  $\mu$ L, DNA esperma de salmón 10 mg/mL 12.5  $\mu$ L, tRNA de levadura 10 mg/mL 12.5  $\mu$ L, DTT 1 M 50  $\mu$ L, Poly A 10 mg/mL 12.5  $\mu$ L (precalentado a 52 °C), la sonda de RNA (sentido o antisentido) desnaturalizada para tener una concentración final de 2  $\mu$ g/mL, se afora con H<sub>2</sub>O a 500  $\mu$ L]. Una vez colocada la solución de hibridación, ésta se distribuyó y se cubrió con un Parafilm y se incubaron las rebanadas 6-10 h a 52 °C en una cámara húmeda de 50% formamida. Posterior a la hibridación, se retiraron las laminillas del horno y se fue retirando el Parafilm dentro de una solución de SSC 1X a 52 °C y fueron colocadas en una rejilla. Se inició el proceso de eliminación del exceso de sonda, para lo cual se realizaron 2 lavados en SSC 2X + 50% formamida a 52 °C por 15 y 20 min respectivamente. Se continuó con 2 lavados más con SSC 2X por 5 min a TA e incubación en RNAsa 50  $\mu$ g/mL en SSC 2X + 1 mM EDTA pH 8.0 por 30 min a 37 °C. Inmediatamente después se realizaron 2 lavados con SSC 2X por 3 min. Se hizo un lavado en SSC 2X + 50% formamida a 52 °C por 15 min y se procedió con el revelado de la sonda con digoxigenina. Para esto, se incubó 1h en Blocking reagent (Sigma) 4% en PBS 1X, 30 min en BSA 2% con 0.3% de Tritón X-100 en solución A [Tris HCl 100 mM pH 7.6 + NaCl 100 mM]. Después se realizaron 2 lavados con solución A por 10 min. Finalmente se incubaron las laminillas con una solución que contenía anticuerpo Anti digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (1:1500) en BSA 1% con 0.15% Tritón X-100 en solución A, durante 24-36h a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se atemperaron los tejidos a TA durante 30 min, se hicieron 2 lavados en solución A por 10 minutos y 2 lavados en solución B [NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris HCl 100 mM pH 9.5] por 10 min e inmediatamente después se procedió con el revelado. En oscuridad, se preparó la solución de revelado con 45  $\mu$ L de NBT (Sigma) + 35  $\mu$ L de BCIP (Sigma) + 2.4 mg de levamisole por cada 10 mL de solución B. El tiempo de revelado fue de aproximadamente 2 h. Para detener la reacción, se hicieron 2 lavados en solución B por 2 min y un enjuague rápido en H<sub>2</sub>O. Para observar la señal en el microscopio, los tejidos se montaron con glicerol 50% en PBS1X y se

cubrieron con un cubreobjetos que fue sellado con barniz de uñas transparente. La señal observada correspondió a un precipitado perinuclear de color morado.

### **7.18 Cuantificación de la hibridación in situ e inmunohistoquímica**

Para tener un mejor contraste de las señales combinadas de la IHC y la ISH, se realizó una tinción en una laminilla con verde de metilo. Para realizar dicha tinción se incubaron las rebanadas en verde de metilo al 1% previamente calentado a 60 °C por 15 s, se enjuagaron con H<sub>2</sub>O y finalmente con glicerol al 50% en PBS 1X; se les colocó un cubreobjeto y fue sellado con barniz de uñas. Así mismo, para identificar las señales, se tomó el criterio de que la señal del mensajero de TRH es perinuclear, mientras que la de c-Fos es nuclear; además para identificar la colocalización de las señales se observaron las imágenes directamente en el microscopio para facilitar la identificación de los colores. Para realizar el conteo se utilizó un sistema de imágenes compuesto por un microscopio Zeiss Axioscop con platinas motorizadas y acoplado a una cámara, ambos conectados a una computadora que cuenta con el programa Mercator de Explora Nova. Con este sistema se delimitó en 5X el área correspondiente a las diferentes regiones del DMN con ayuda de una rebanada contigua teñida con azul de toluidina y con el Atlas de Paxinos del cerebro de ratón. Luego se colocó una cuadrícula virtual de 50 µm sobre la región marcada. El conteo fue realizado sobre 6 a 9 rebanadas para cada animal a 40X. Se puso una marca distinta para cada señal: *Trh*<sup>+</sup>, c-Fos<sup>+</sup> y colocalización. Para la determinación numérica del conteo, se realizó un promedio del número total de células marcadas por rebanada para cada categoría. Es decir, para cada rebanada se contó el lado izquierdo y derecho; se sumaron ambos lados para todas las rebanas y se obtuvo el promedio por rebanada de cada animal para todas las categorías.

### **7.19 Estadística**

Los histogramas representan el promedio  $\pm$  error estándar de la media (ESM); se construyeron con Microsoft Excel 2013. En el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Versión 5. Primero se realizó un análisis de la homogeneidad de las varianzas (Levene) y si no se obtuvo significancia, se procedió a hacer un ANOVA de un factor o variable. Si la prueba de ANOVA arrojó un



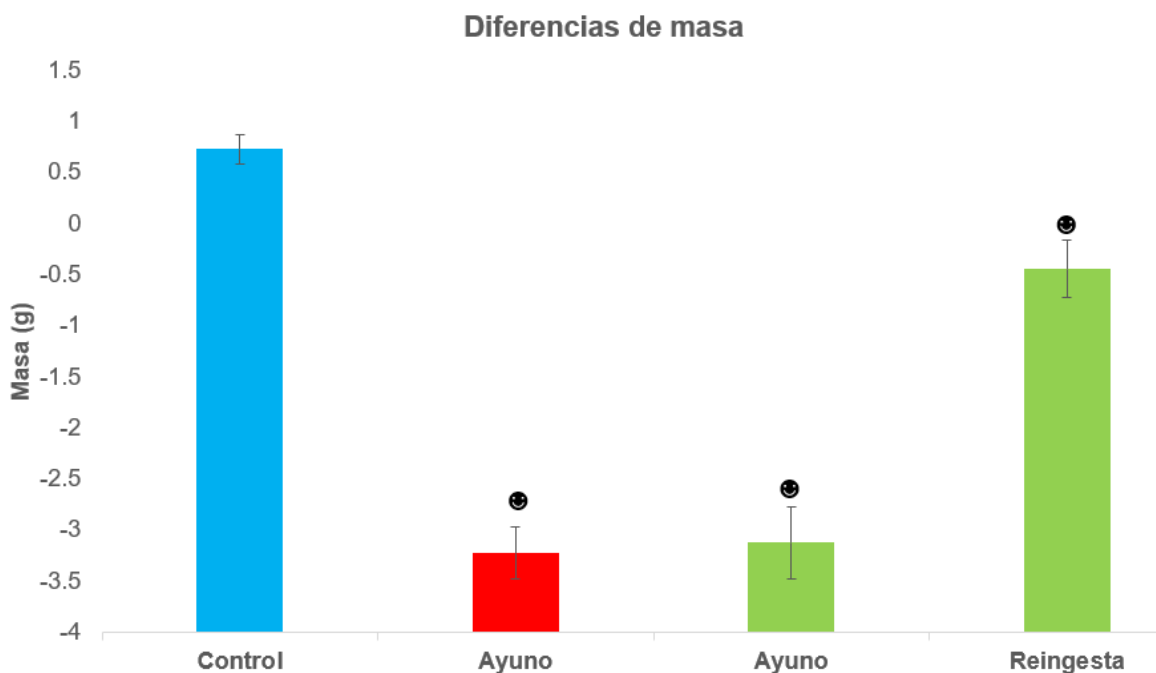
resultado con un valor  $p < 0.05$ , se realizó un análisis de Tukey para observar las diferencias significativas entre los distintos grupos de datos. En las gráficas, se indicaron los valores de significancia de la prueba de Tukey: cuando un resultado obtuvo un valor  $p < 0.01$  se colocó el símbolo ☹. En las gráficas se muestran unas barras de error que corresponden a la desviación estándar.

## 8. Resultados

### 8.1 Efecto del ayuno y de la reingesta en el consumo de alimento y la masa corporal de los animales

Para corroborar que los tratamientos a los que fueron sometidos los animales tuvieran el efecto esperado, se registraron las masas corporales de cada animal al inicio y al final de cada tratamiento. Se calcularon los cambios de masa corporal en cada grupo de animales (Figura 4).

Adicionalmente se midió la masa del alimento consumido en el grupo *ad libitum* y en el grupo reingesta al inicio y al final del experimento. A lo largo de 24 h, el grupo *ad libitum* consumió 10.4 g de alimento, mientras que el grupo reingesta consumió 3.1 g de éste durante 3 horas.



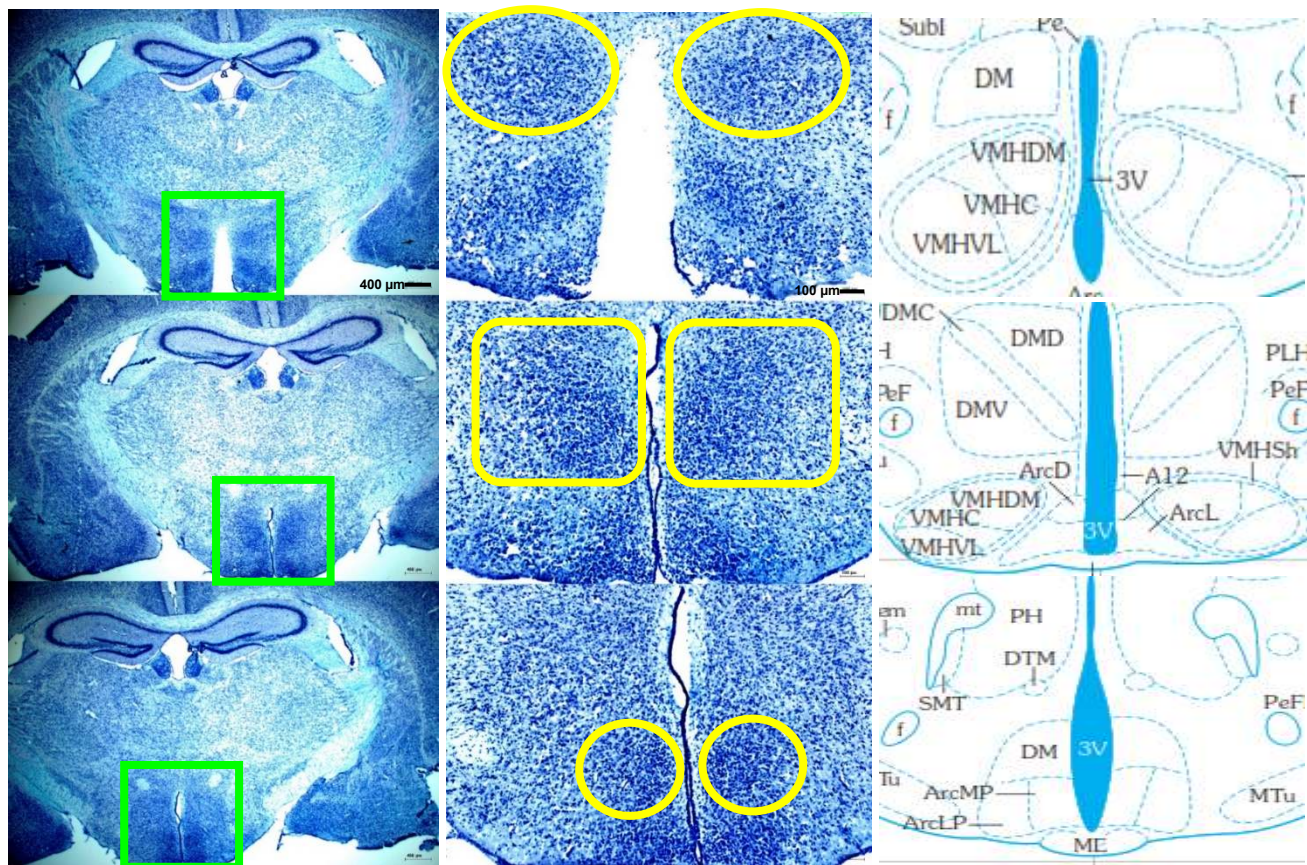
**Figura 4. Efecto de ayuno y reingesta sobre el cambio de masa corporal en 24h**

Los datos (experimento #2) fueron obtenidos restando la masa corporal a las 24 h a la masa inicial del animal. En azul se encuentra el grupo control; en rojo, el grupo ayunado; en verde, el grupo con reingesta, dividido en los datos post-ayuno y en los datos post-reingesta. Los grupos ayuno muestran una diferencia significativa contra el grupo control. El grupo de reingesta mostró un cambio significativo contra el grupo control; así mismo se observó un cambio significativo entre el grupo de reingesta y el grupo de ayuno.  $P < 0.01$ .  $n = 3$  en todos los casos.

A partir de la información obtenida del cambio de masa de cada grupo a lo largo del experimento, se puede afirmar que el periodo de ayuno fue suficiente para ocasionar una disminución en el peso corporal de los animales. Del mismo modo, la reingesta ocasionó un incremento significativo en las masas de los animales posterior al ayuno; sin embargo, las 3 h de reingesta post ayuno, no fueron suficientes para recuperar su masa inicial anterior al periodo de ayuno.

## **8.2 Visualización del núcleo dorsomedial**

Para visualizar la estructura anatómica del DMN de ratón, se hicieron tinciones en rebanadas coronales de 20  $\mu\text{m}$  con azul de toluidina, este material se obtuvo de un animal sin tratamiento. Comparando las rebanadas teñidas con el mapa del cerebro de ratón de Paxinos y Franklin 2013, se logró la identificación del DMN a lo largo de los cortes (Figura 5).



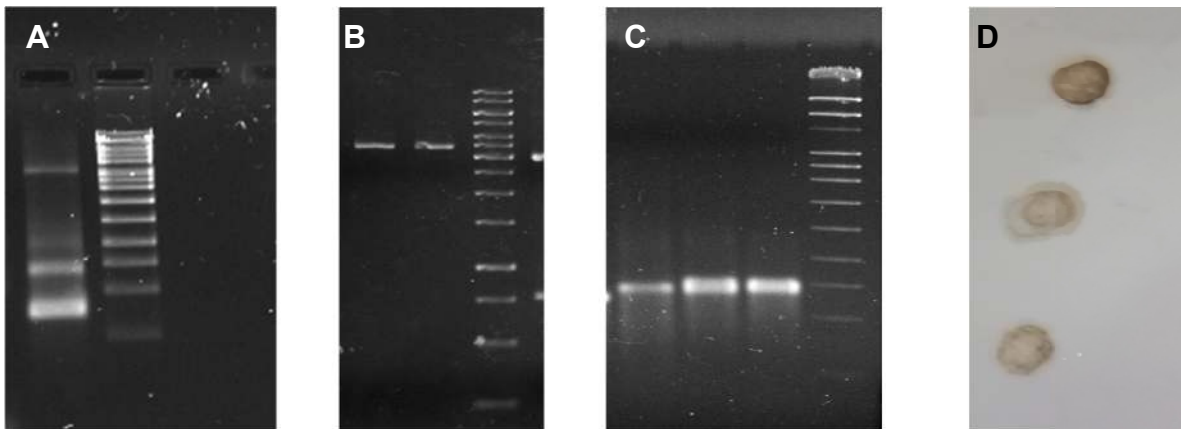
**Figura 5. Localización del DMN en cortes coronales del cerebro de ratón**

Las micrografías de la izquierda fueron tomadas en campo claro con el objetivo de 1.25 X y las de la derecha con el objetivo de 5X. A la izquierda en verde se encuentra indicada la zona del hipotálamo que contiene al DMN. A la derecha se amplifica la zona marcada en verde y se indica el contorno del DMN con color amarillo. Paneles superiores a nivel del Bregma -1.70 mm, paneles intermedios a nivel del Bregma -1.94 mm y paneles inferiores a nivel del Bregma -2.06 mm.

Se pudo observar que la morfología del DMN va cambiando en función de la distancia al Bregma. En la parte más anterior, el DMN presenta una posición más dorsal; mientras que, en las rebanadas posteriores, el DMN presenta una posición más ventral.

### 8.3 Síntesis de sondas marcadas con UTP-digoxigenina sentido y antisentido del ARN mensajero de TRH

Para la obtención de las sondas sentido (S) y antisentido (AS) del ARN mensajero de TRH, se realizó un proceso en distintas etapas. Primero se purificó el plásmido pGEM-T que contiene un segmento del ADNc de *Trh* (Figura 6A). Luego se linearizó el plásmido (Figura 6B) y se realizó la transcripción *in vitro* con UTP-digoxigenina tanto para la sonda S como para la AS (Figura 6C). Finalmente se purificó el transcrito obteniéndose una cantidad aproximada de 15 µg y una relación 260/280 nm de 1.8. Se confirmó la incorporación de digoxigenina en las sondas por dot blot (Figura 6D).

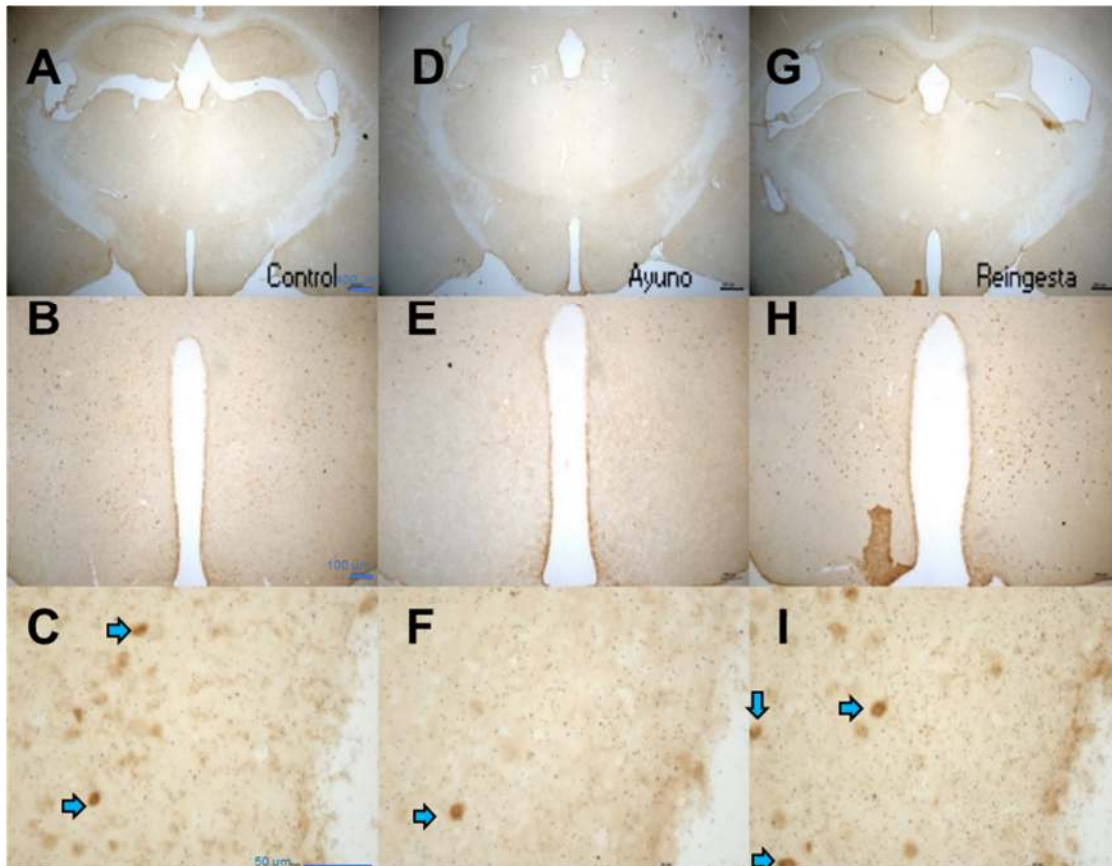


**Figura 6. Purificación y linearización del plásmido pGEM-T y síntesis de las sondas marcadas con UTP- digoxigenina contra el mensajero de TRH**

**A.** Purificación del plásmido pGEM-T. El plásmido se encuentra en el carril izquierdo, en el carril central se encuentra el marcador de peso molecular. **B.** Plásmido pGEM-T linearizado con NcoI (para la sonda antisentido) en carril izquierdo y con SpeI (sonda sentido) en carril de en medio, marcador de pares de bases en carril derecho. **C.** De izquierda a derecha: En el primer carril, sonda sentido; en segundo y tercer carril, sonda antisentido; en cuarto carril, marcador de pares de bases. **D** Dot blot de las sondas de cRNA para el mensajero de TRH, de arriba hacia abajo: control positivo (RNA control marcado con digoxigenina, Roche), sonda antisentido y sonda sentido.

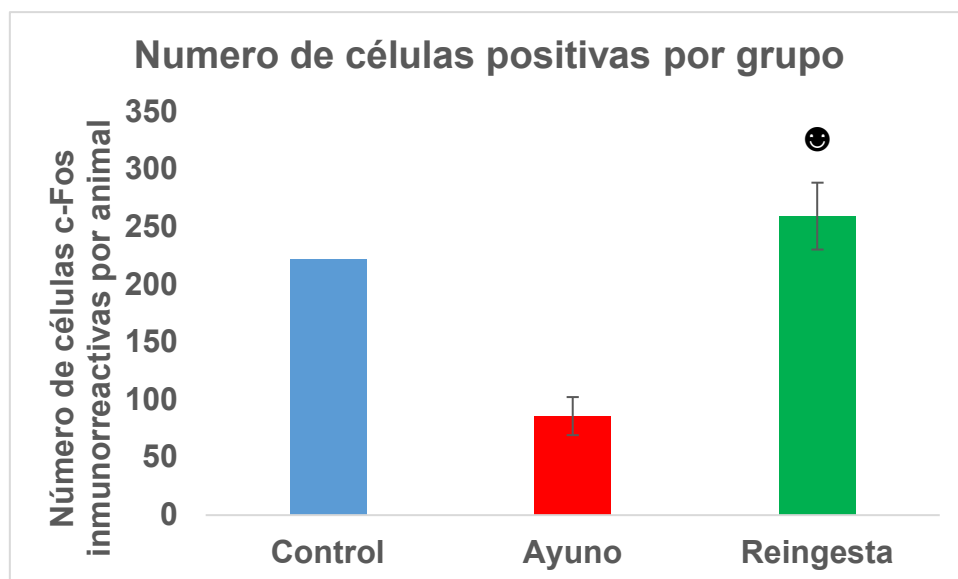
#### **8.4 Inmunohistoquímica contra c-Fos**

La transcripción y traducción de c-Fos se incrementa en las neuronas que son eléctricamente activas, por lo que su expresión se utiliza como un marcador de actividad neuronal (Bentivoglio et al., 1993). Se realizó una prueba preliminar de inmunohistoquímica contra c-Fos en rebanadas en flotación con un animal control, otros ayunados, y otros con reingesta (exp # 1). Posteriormente, se realizó un conteo del número de células inmunorreactivas para c-Fos en el DMN y se hizo un análisis estadístico. Es importante hacer notar que en el análisis estadístico no se incluyó al grupo control, ya que por error de diseño sólo se contaba con una N de 1 (Figuras 7y 8).



**Figura 7. Identificación de células c-Fos inmunorreactivas de rebanadas en flotación**

**A, B y C** condición control a 1.25 X, 5 X, y 20 X respectivamente. **D, E, y F** condición ayuno a 1.25 X, 5 X, y 20 X respectivamente. **G, H e I** condición de reingesta a 1.25 X, 5 X, y 20 X respectivamente.



**Figura 8. Influencia del tratamiento sobre el número de células c-Fos inmunorreactivas en el DMN**

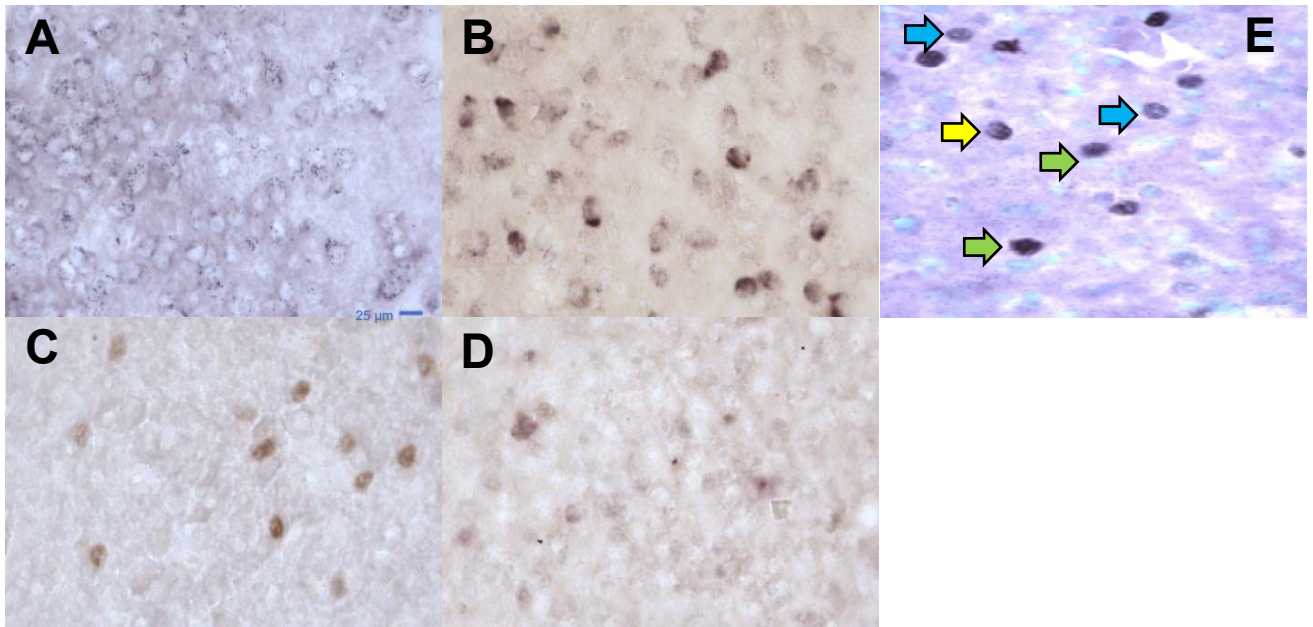
En este experimento, se sumaron todas las células positivas detectadas en varios cortes a lo largo del DMN. Se observa que hay un mayor número de células c-Fos positivas en el grupo de reingesta en comparación con el grupo de ayuno.  $P < 0.01$

Al comparar el número de células c-Fos inmunorreactivas resulta claro que en el DMN se incrementa el número de células activas pasando de un estado de ayuno a un estado de reingesta.

### 8.5 Inmunohistoquímica de c-Fos e hibridación *in situ* para el mensajero de *Trh*.

En el experimento # 2 se realizó la inmunohistoquímica de c-Fos y posteriormente la hibridación *in situ* del mensajero de *Trh*. Para confirmar la especificidad de las señales, se tomaron en cuenta diversos controles mostrados a continuación (Figura 9). Los controles muestran que no se observan señales si se usa la sonda sentido en la hibridación *in situ* o se omite el anticuerpo primario para la inmunohistoquímica, y que se pueden distinguir células doblemente positivas de las tinciones sencillas. Además, se realizó el conteo de células que presentaron las señales (Figura 10), así como un análisis estadístico (Figura 11). Cabe hacer notar

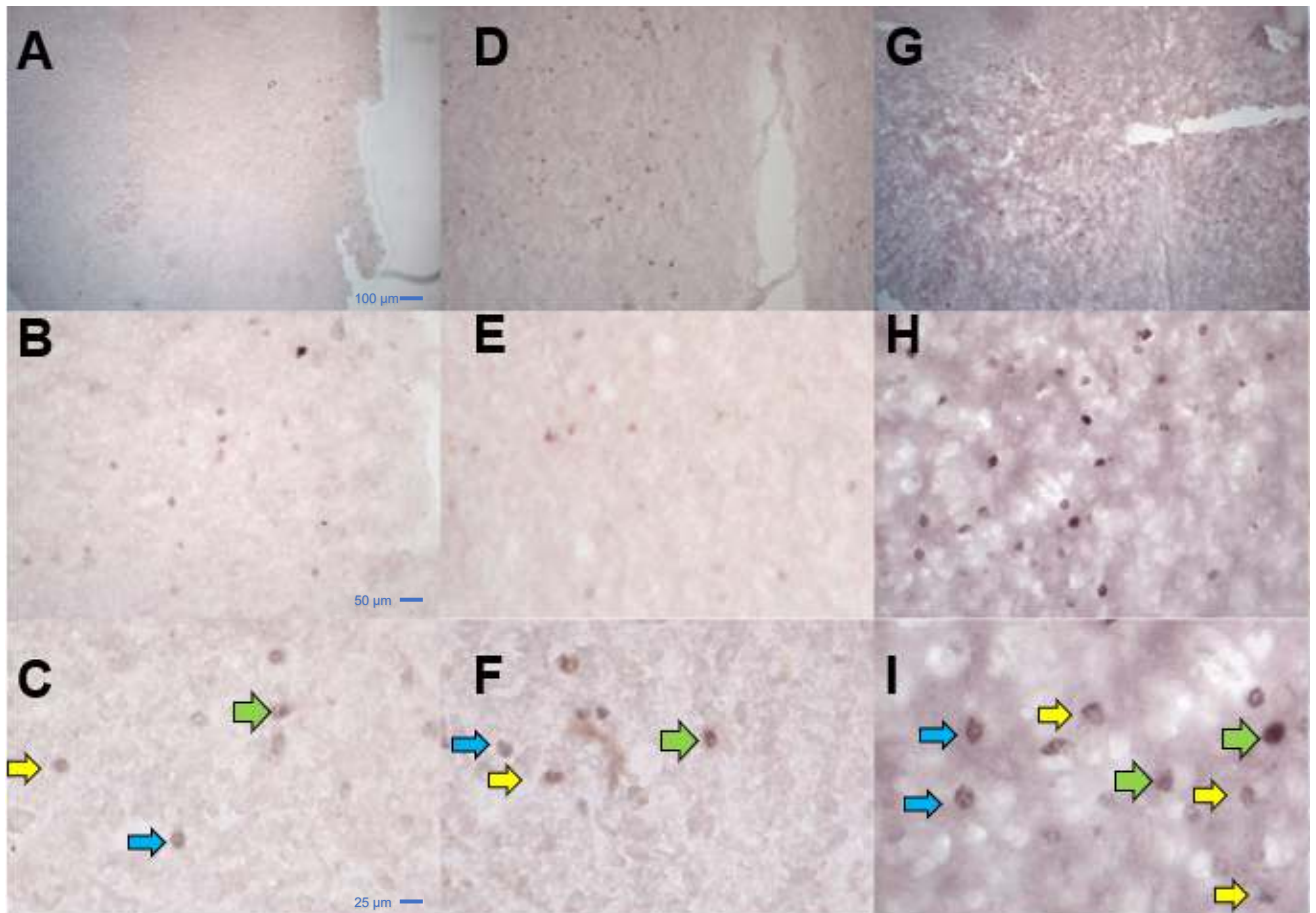
que en las neuronas de TRH la activación neuronal se acompaña de un incremento de la cantidad de transcrito de *Trh*, por lo que el número de neuronas detectadas por hibridación *in situ* puede incrementarse. El conteo de las neuronas *Trh* positivas es entonces un marcador alternativo de activación de las neuronas de TRH.



**Figura 9. Micrografías de los controles utilizados para la IHC y la ISH**

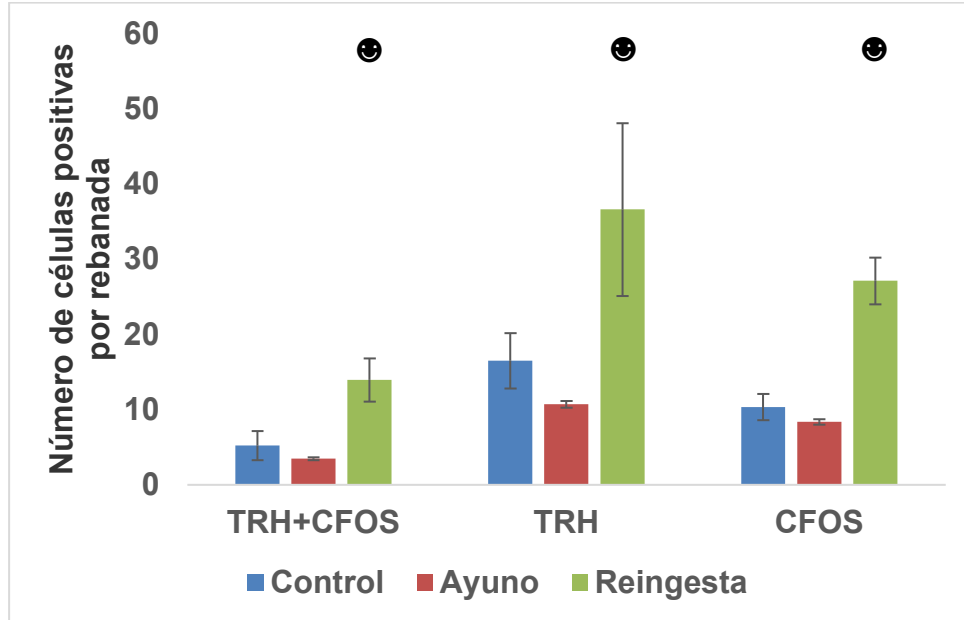
A, B, C, D y E corresponden a un animal del grupo de reingesta y se encuentran a 40X. A y B únicamente pasaron por la técnica de ISH para *Trh*; A se hibridó con una sonda sentido, mientras que B con una sonda antisentido. C pasó por ISH con sonda sentido contra *Trh* y por IHC anti c-Fos. D pasó por ISH con sonda antisentido contra *Trh*, pero en la IHC no se utilizó anticuerpo primario. E pasó por ISH con sonda antisentido anti *Trh* y por IHC anti c-Fos; además se realizó una tinción con verde de metilo. En E se indica con azul células c-Fos positivas, con amarillo células positivas para el mensajero de *Trh* y en verde la colocalización de las señales.





**Figura 10. Micrografías de los DMN de animales control, ayunados o con reingesta con doble tinción para ARNm de *Trh* y c-Fos**

A, B y C se encuentran a 10X, 20X y 40X respectivamente, pertenecen a un animal del grupo control. D, E y F se encuentran a 10X, 20X y 40X respectivamente, pertenecen a un animal del grupo ayunado. G, H e I se encuentran a 10X, 20X y 40X respectivamente, pertenecen a un animal del grupo reingesta. Se indica con azul las células c-Fos positivas, con amarillo las células positivas para el mensajero de *Trh* y en verde la colocalización de las señales.



**Figura 11. Número de células positivas para el mensajero de *Trh* y/o c-Fos por rebanada de DMN**

En todos los casos se observa que hay una diferencia significativa en el grupo de reingesta en contraste con los otros dos grupos. Sin embargo, no parece haber diferencias entre el grupo control con el grupo ayuno.  $P < 0.01$  para el grupo TRH+C-FOS.  $P < 0.01$  para el grupo TRH.  $P < 0.01$  para el grupo C-FOS.  $n = 3$  en cada grupo.

A partir de los resultados obtenidos con este experimento, se puede observar que en el DMN no hay diferencias en el número de células c-Fos inmunorreactivas entre el grupo control y el grupo de ayuno; pero sí hay un incremento de éstas en el grupo de reingesta. Con las células positivas para el mensajero de *Trh* ocurre algo similar a lo observado con las células c-Fos positivas. Finalmente, del mismo modo sucede con el número de células que colocan ambas señales.

## 9. Discusión

En este trabajo, utilizamos el modelo de ayuno y reingesta en el ratón adulto macho para determinar si las neuronas TRHérgicas del DMN son sensibles al estado del balance energético. El modelo de ayuno / reingesta produjo resultados esperados. Así, se observó que el peso corporal disminuye con el ayuno y aumenta con la reingesta. Por otro lado, se pudo observar que en el DMN no hay diferencias en el número de células c-Fos inmunorreactivas entre el grupo control y el grupo de ayuno, pero sí hubo, en 2 experimentos independientes, un incremento de éstas en el grupo de reingesta. Este incremento es consistente con un estudio realizado en 2007 por Singru et al., en ratas en el cual se observó que después de un ayuno por 3 días, un periodo de reingesta de 2 horas incrementa el número de células inmunorreactivas para c-Fos en distintos núcleos del hipotálamo, entre ellos el DMN. Por lo tanto, el protocolo utilizado provocó cambios notables, tanto durante la reingesta.

Sin embargo, los experimentos realizados en esta tesis indican que el ayuno por 24 h en ratones macho de 2 meses de edad no generó cambio significativo en el número de células TRHérgicas activas, según el criterio de expresión de c-Fos, o del número total de células que expresan el ARNm de *Trh*. Por el contrario, sí hubo un incremento del valor de ambas determinaciones posterior al periodo de reingesta de 3 h. Por lo tanto, estos datos indican que la actividad de neuronas TRHérgicas del DMN de ratón macho adulto es incrementada durante la reingesta posterior a un ayuno de 21 h. Los datos presentados en esta tesis son en parte consistentes con otros datos del laboratorio obtenidos en ratones macho adultos en condiciones analíticas distintas que muestran un incremento en el número de neuronas TRHérgicas en el grupo de reingesta (Vargas, no publicado). Las señales que contribuyen a este incremento de actividad, y su consecuencia funcional son todavía desconocidos.

Un aspecto que no se analizó en esta tesis es la localización precisa de las neuronas TRHérgicas sensibles a reingesta en el DMN. En una observación reciente, Yamili Vargas observó en condiciones experimentales ligeramente distintas (ratones que expresan una proteína fluorescente bajo el promotor de TRH)

que, si bien hay neuronas TRHérgicas activadas por reingesta en ratones macho adultos, estas neuronas tienden a confinarse a la región posterior del DMN, sugiriendo una heterogeneidad funcional de estas neuronas. En el futuro será importante saber si esta heterogeneidad funcional puede asociarse a fenotipos neuronales distintos (receptores o proyecciones p.e.). Una de las incógnitas es el fenotipo exacto de las neuronas TRHérgicas del DMN; ¿qué otros neurotransmisores expresan? Por ejemplo, si expresan péptidos, ¿son los mismos cuyas respuestas al ayuno han sido descritas? ¿Cuáles son los receptores expresados por estas neuronas? ¿Expresan receptores a leptina, insulina o TrkB? Si estuvieran expresando al TrkB, sabríamos mucho más sobre su papel fisiológico, ya que las neuronas del DMN que expresan TrkB son necesarias y suficientes para controlar la ingesta de alimentos (Liao et al., 2019). Sin embargo, los antecedentes del laboratorio sugieren que no es el caso, ya que en el laboratorio se ha mostrado que las neuronas hipotalámicas TRHérgicas de rata fetal se pueden separar en 2 grupos: neuronas TrkB positivas, que coinciden con las neuronas del PVN, y neuronas TrkB negativas, que pudieran incluir a las del DMN (Guerra-Crespo et al., 2001, Ubieta et al., 2007). De todas formas, esta pregunta requiere una estrategia más precisa para resolverse.

Otra de las preguntas fundamentales que generan estos datos es la naturaleza de las señales que inducen la activación de las neuronas TRHérgicas durante la reingesta. Estas señales pudieran ser metabólicas, hormonales y/o nerviosas. A continuación, exploramos algunas ideas de interpretación.

El ayuno genera diversos efectos metabólicos que dependen de la prolongación de éste. Por ejemplo, en ratones se ha detectado que en un periodo de ayuno de 4 h se presenta un incremento en la glucogenólisis en hígado, pero un decremento de ésta a las 24 h de ayuno así como un incremento en factores de transcripción y proteínas relacionadas con la gluconeogénesis y un incremento en la concentración de ácidos grasos libres en sangre, especialmente el  $\beta$ -hidroxibutirato, pero no un cambio en la concentración de urea por lo que se

descarta que a las 24 h de ayuno haya degradación de proteínas (Champy et al., 2004, Gavrilova et al., 1999, Heijboer et al., 2005).

En ratones, durante el ayuno se ven disminuidas las concentraciones en plasma de leptina e insulina. Sin embargo, cuando llega el periodo de reingesta, el nivel de leptina llega a niveles basales durante la primera hora y los niveles de insulina se ven incrementados drásticamente en comparación con los niveles basales (Wu et al., 2013). Este dato hace importante explorar la posibilidad de que la respuesta observada en este trabajo en el DMN del grupo reingesta podría deberse a la insulina.

Algo muy conocido es que la insulina estimula a neuronas POMC del ARC generando una respuesta anorexigénica (Barsh et al., 2002). Si bien la dirección de este razonamiento se apoya en que las neuronas del ARC reciben la señal de la insulina en plasma, no se debe descartar la idea de que la insulina puede atravesar la barrera hematoencefálica (Banks et al., 2012). En 1986 Corp et al publicaron un experimento donde bañaron rebanadas de cerebro de rata con insulina marcada con  $I^{125}$  y vieron a través de autoradiografías que distintas áreas del hipotálamo estaban fuertemente marcadas, entre ellas el DMN (Corp et al., 1986). Con base en dichas publicaciones es posible que la alza en el número de células TRHérgicas activas en el DMN observadas en este trabajo en el grupo de reingesta esté intrínsecamente relacionado a un posible aumento en la concentración de insulina plasmática. Sin embargo, faltaría mostrar que las neuronas TRHérgicas del DMN expresen receptores de insulina, porque hasta el momento no hay estudios que confirmen dicha suposición.

Otra hormona que se ve incrementada a nivel periférico y central posterior a la ingesta de alimentos es el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). Uno de los efectos que tiene a nivel periférico es potenciar la liberación de insulina y retrasar el vaciamiento intestinal, mientras que a nivel central se le ha asociado a la disminución del apetito y a la sensación de saciedad (Andersen et al., 2018). Además, se sabe que en el núcleo del tracto solitario (NTS) existe una población de neuronas de GLP-1 que proyectan al DMN, sin mencionar que se han encontrado

receptores de GLP-1 en el DMN y que animales nulos para estos receptores en el DMN manifiestan una ganancia en la masa corporal (Trapp, 2013, Lee, 2018). Así, otra hipótesis es que las neuronas TRHérgicas del DMN están abajo de la cascada de señalización de las neuronas GLP-1 del NTS. Sin embargo, es importante destacar que las neuronas de POMC del ARC tienen receptores para insulina y GLP-1 y que existe una proyección de neuronas POMC del ARC al DMN, sin mencionar que en el DMN se han encontrado receptores MC4R (Varela et al., 2012, Wei et al., 2018, Millington 2007). Por lo cual también cabe la posibilidad de que las neuronas TRHérgicas del DMN sean activadas por esta proyección desde el ARC durante la reingesta. A pesar de que se ha observado que la administración de GLP-1 tiene como efecto la disminución de masa corporal, en ratones nulos para el receptor de GLP-1 en neuronas POMC del ARC sólo se presenta una tendencia en la disminución de la masa de éstos en comparación con el control, pero no hay diferencias significativas (Burmeister et al., 2016). Lo cual sugiere que es posible que las neuronas POMC con receptores GLP-1 del ARC tengan un efecto cooperativo con otras vías para modular el peso corporal.

Otra interrogante importante es cuál sería el significado fisiológico de la activación de las neuronas TRHérgicas del DMN durante la reingesta. En la introducción se mencionaron evidencias con estudios por lesiones y electroestimulación del hipotálamo lateral en distintos modelos animales, que sugieren que éste tiene una función importante en la homeostasis energética. En 2003 el grupo de Chou, a través de marcajes retrógrados con la toxina B del cólera, demostró que cerca de un tercio de las neuronas TRHérgicas del DMN lanzan proyecciones hacia el hipotálamo lateral. Posteriormente en 2012 el grupo de van den Pol, por medio de electrofisiología y de inmunohistoquímica, demostró que en el hipotálamo lateral hay neuronas de MCH que se encuentran reguladas de manera indirecta por neuronas TRHérgicas a través de neuronas GABAérgicas. En conjunto estos datos sugieren que algunos de los efectos del hipotálamo lateral en el balance energético podrían estar influenciados por esta conexión. Por lo tanto, una hipótesis que surge de nuestra observación es que en ratones la actividad de las neuronas

TRHérgicas del DMN contribuye a generar señales de saciedad en el transcurso de un evento de reingesta posterior a un ayuno prolongado.

## **10. Conclusión**

Con base en lo publicado y en los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que en el DMN hay una población de neuronas TRHérgicas sensible a señales provocadas por la ingesta de alimento posterior a un ayuno. Las señales responsables de esta reactivación pudieran incluir la insulina y otras hormonas o neuromediadores regulados por la re-ingesta, tal como el GLP-1. La activación de esta población pudiera generar señales de saciedad gracias a que proyectan indirectamente hacia las neuronas MCH del hipotálamo lateral, a través de interneuronas GABAérgicas.

## **11. Perspectivas**

Para probar la hipótesis de que cambios en las concentraciones circulantes de insulina y/o de GLP-1 son importantes para activar las neuronas de TRH del DMN, se sugiere:

- a) Hacer un experimento para comparar a nivel celular la localización de receptores de insulina y GLP-1, así como el mensajero de *Trh* en el DMN.
- b) Realizar una inmunohistoquímica de c-Fos y una ISH para el mensajero de *Trh* en ratones a los cuales se les inyecte insulina o GLP-1 y compararlo con un grupo control.

## 12. Referencias

1. Acosta-Galvan, G., Yi, C.-X., van der Vliet, J., Jhamandas, J. H., Panula, P., Angeles-Castellanos, M., ... Buijs, R.M. (2011). Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 108(14), 5813–5818.
2. Adams, S. H., Won, W. B., Schonhoff, S. E., Leiter, A. B., & Paterniti, J. R. (2004). Effects of peptide YY[3–36] on short-term food intake in mice are not affected by prevailing plasma ghrelin levels. *Endocrinology*, 145(11), 4967–4975.
3. Andersen, A., Lund, A., Knop, F. K., & Vilsbøll, T. (2018). Glucagon-like peptide 1 in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 14(7), 390–403.
4. Asakawa, A., Inui, A., Kaga, O., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., ... Kasuga, M. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, 120(2), 337–345.
5. Aschner B. (1912). Über die funktion der hypophyse. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 146, 1-146.
6. Banks, W. A., Owen, J. B., & Erickson, M. A. (2012). Insulin in the brain: There and back again. *Pharmacology & Therapeutics*, 136(1), 82–93.
7. Barquera S, et al., Encuesta nacional de salud y nutrición, INSP, 2012.
8. Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews Genetics*, 3(8), 589–600.
9. Bauer, P. V., Hamr, S. C., & Duca, F. A. (2015). Regulation of energy balance by a gut–brain axis and involvement of the gut microbiota. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(4), 737–755.
10. Beall, C., Ashford, M. L., & McCrimmon, R. J. (2012). The physiology and pathophysiology of the neural control of the counterregulatory response. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 302(2), R215–R223.



11. Bellinger, L. L., & Bernardis, L. L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation. *Physiology & Behavior*, 76(3), 431–442.
12. Bender AE, et al. (1987). *Body weight control*, Churchill Living-stone, Ed. London.
13. Bentivoglio, M., Chen, S., Peng, Z.-C., Bertini, G., Ringstedt, T., & Persson, H. (1993). 26 - Thalamus, Neurotrophins and their Receptors. *Thalamic Networks for Relay and Modulation*. Pergamon Studies in Neuroscience, 309-320.
14. Bernardis, L. L. (1970). Participation of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the “feeding center” and water intake circuitry of the weanling rat. *Journal of Neuro-Visceral Relations*, 31(4), 387–398.
15. Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1993). The lateral hypothalamic area revisited: Neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 17(2), 141–193
16. Bernardis, L. L., & Bellinger, L. L. (1996). The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 20(2), 189–287.
17. Bi, S., & Moran, T. H. (2002). Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: Lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat. *Neuropeptides*, 36(2-3), 171–181.
18. Bouret, S. G. (2004). Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. *Journal of Neuroscience*, 24(11), 2797–2805.
19. Brugger, M. (1943). *Fresstrieb als hypothalamisches symptom*. *Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta*. 1: 183-189.
20. Burbach, JP. (2011). What are neuropeptides. *Methods in Molecular Biology*, 789, 1-36.
21. Burmeister, M. A., Ayala, J. E., Smouse, H., Landivar-Rocha, A., Brown, J. D., Drucker, D. J., ... Ayala, J. E. (2016). The hypothalamic glucagon-like

- peptide 1 receptor is sufficient but not necessary for the regulation of energy balance and Glucose homeostasis in mice. *Diabetes*, 66(2), 372–384.
22. Butte, N.F., Ekelund, U., Westerterp, K.R. (2012). Assessing physical activity using wearable monitors: measures of physical activity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 44(1 Suppl 1):S5-12.
23. Campbell, M.K. (2015). Biological, environment and social influences on childhood obesity, *Pediatric Research*, 79, 205–211.
24. Chaffer, C. L., & Morris, M. J. (2002). The feeding response to melanin-concentrating hormone is attenuated by antagonism of the NPY Y1-receptor in the rat. *Endocrinology*, 143(1), 191–197.
25. Champy M.F., Selloum M., Piard L., et al. (2004) Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions. *Mammalian Genome*, 15: 768–783.
26. Chertorivski-Woldenberg, S. (2012) Encuesta nacional de salud y nutrición, INSP.
27. Chou, T. C., Scammell, T. E., Gooley, J. J., Gaus, S. E., Saper, C. B., & Lu, J. (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *The Journal of Neuroscience*, 23(33), 10691–10702.
28. Corp, E. S., Woods, S. C., Porte, D., Dorsa, D. M., Figlewicz, D. P., & Baskin, D. G. (1986). Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neuroscience Letters*, 70(1), 17–22.
29. Curran, T., Rauscher, F. J. 3rd, Cohen, D. R. y Franza, B. R. Jr. (1988). Beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors. *Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Biology*, 2:769-77.
30. De Gortari, P., Uribe, R. M., García-Vázquez, A., Aguilar-Valles, A., Martínez, A., Valdés, A., ... Joseph-Bravo, P. (2006). Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochemistry International*, 48(1), 31–42.

31. Dossat, A. M., Diaz, R., Gallo, L., Panagos, A., Kay, K., & Williams, D. L. (2013). Nucleus accumbens GLP-1 receptors influence meal size and palatability. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 304(12), E1314–E1320.
32. Fekete, C., Kelly, J., Mihály, E., Sarkar, S., Rand, W. M., Légrádi, G., ... Lechan, R. M. (2001). Neuropeptide Y Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. *Endocrinology*, 142(6), 2606–2613.
33. Fekete, C., Lechan, R.M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*, 35:159–194.
34. Gautron, L., Lazarus, M., Scott, M. M., Saper, C. B., & Elmquist, J. K. (2010). Identifying the efferent projections of leptin-responsive neurons in the dorsomedial hypothalamus using a novel conditional tracing approach. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(11), 2090–2108.
35. Gavrilova, O., Leon, L.R., Marcus-Samuels, B., et al. (1999). Torpor in mice is induced by both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 96: 14623–14628.
36. Gotoh, K., Fukagawa, K., Fukagawa, T., Noguchi, H., Kakuma, T., Sakata, T., & Yoshimatsu, H. (2007). Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *Journal of Neurochemistry*, 103(3), 1102–1110.
37. Groessl, F., Jeong, J. H., Talmage, D. A., Role, L. W., & Jo, Y.-H. (2013). Overnight fasting regulates inhibitory tone to cholinergic neurons of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS ONE*, 8(4), e60828.
38. Grossman, S., Dacey, D., Halaris, A., Collier, T., & Routtenberg, A. (1978). Aphagia and adipsia after preferential destruction of nerve cell bodies in hypothalamus. *Science*, 202(4367), 537–539.
39. Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J.-L., & Pérez-Martínez, L. (2001). BDNF increases the early expression of TRH mRNA in

- fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *European Journal of Neuroscience*, 14(3), 483–494.
40. Guerrero-Castro, J., Lozano, L., & Sohlenkamp, C. (2018). Dissecting the Acid Stress Response of *Rhizobium tropici* CIAT 899. *Frontiers in Microbiology*, 9.
41. Heijboer, A.C., Donga, E., Voshol, P.J., et al. (1981). Sixteen hours of fasting differentially affects hepatic and muscle insulin sensitivity in mice. *The Journal of Lipid Research*, 46: 582–588.
42. Hervieu, G. J. (2006). Further insights into the neurobiology of melanin-concentrating hormone in energy and mood balances. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 10(2), 211–229.
43. Hetherington, A. W., & Ranson, S. W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*, 78(2), 149–172.
44. Heuer, H., Schäfer, M. K., Bauer, K. (1999) Thyrotropin-releasing hormone (TRH), a signal peptide of the central nervous system. *Acta Medica Austriaca*, 26(4):119-22.
45. Hollenberg, A. N. (2008). The role of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as a metabolic sensor. *Thyroid*, 18(2), 131–139.
46. Horjales-Araujo, E., Hellysaz, A., Broberger, C., (2014). Lateral hypothalamic thyrotropin-releasing hormone neurons: distribution and relationship to histochemically defined cell populations in the rat. *Neuroscience*, 277, 87-102.
47. Horst, G. J. T., & Luiten, P. G. M. (1986). The projections of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the rat. *Brain Research Bulletin*, 16(2), 231–248.
48. Jefferson AB, Travis SM y Schulman H. (1991) Activation of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodullin-dependent protein kinase in GH3 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 266(3):1484-90.
49. Jensen, T., Kiersgaard, M., Sørensen, D., & Mikkelsen, L. (2013). Fasting of mice: a review. *Laboratory Animals*, 47(4), 225–240.
50. Joseph-Bravo P, Jaimes-Hoy L, Maria UR, Charli JL. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: TRH, the first hypophysiotropic releasing

- hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *Journal of Endocrinology*, 226:T85–T100.
51. Kádár, A., Sánchez, E., Wittmann, G., Singru, P. S., Füzési, T., Marsili, A., ... Fekete, C. (2010). Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 518(19), 3948–3961.
52. Karra, E., Chandarana, K., & Batterham, R. L. (2009). The role of peptide YY in appetite regulation and obesity. *The Journal of Physiology*, 587(1), 19–25.
53. Kelley, W. N. (1993). *Medicina interna*, 2<sup>a</sup> ed, Ed. Médica Panamericana.
54. Kojima, M., & Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews*, 85(2), 495–522.
55. Leblanc J. (1986). Thermogenesis with relation to exercise and exercise-training. *Acta Medica Scandinavia*, Suppl.;711:75–81
56. Lechan, R. M., & Fekete, C. (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*, 153:209-35.
57. Lechan, R.M., Jackson, I.M. (1982). Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 111(1):55-65.
58. Lee, S. J., Sanchez-Watts, G., Krieger, J.-P., Pignalosa, A., Norell, P. N., Cortella, A., ... Watts, A. G. (2018). Loss of dorsomedial hypothalamic GLP-1 signaling reduces BAT thermogenesis and increases adiposity. *Molecular Metabolism*, 11, 33–46.
59. Li, J. B., and Wassner, S. J. (1981). Muscle degradation in uremia: 3-Methylhistidine release in fed and fasted rats. *Kidney International*, 20, 321-325.
60. Liao, G.Y., Kinney, C.E., An, J.J., and Xu, B. (2019). TrkB-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus are necessary and sufficient to suppress homeostatic feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 116 (8) 3256-3261.

61. Lo, M.-T., Chiang, W.-Y., Hsieh, W.-H., Escobar, C., Buijs, R. M., & Hu, K. (2016). Interactive effects of dorsomedial hypothalamic nucleus and time-restricted feeding on fractal motor activity regulation. *Frontiers in Physiology*, 7, 174.
62. Ma, X., Lin, L., Qin, G., Lu, X., Fiorotto, M., Dixit, V. D., & Sun, Y. (2011). Ablations of ghrelin and ghrelin receptor exhibit differential metabolic phenotypes and thermogenic capacity during aging. *PLoS ONE*, 6(1), e16391.
63. Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., ... Kangawa, K. (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(3), 905–908.
64. Menahan, L. A., & Sobocinski, K. A. (1983). Comparison of carbohydrate and lipid metabolism in mice and rats during fasting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 74(4), 859–864.
65. Millington, G. W. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. *Nutrition & Metabolism*, 4(1), 18.
66. Münzberg, H., Qualls-Creekmore, E., Berthoud, H.-R., Morrison, C. D., & Yu, S. (2016). Neural control of energy expenditure. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 233, 173–194.
67. Nakamura K, Morrison SF. (2008). A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nature Neuroscience*, 11:62–71.
68. Nakamura, K., Morrison, SF. (2010). A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 107:8848–8853.
69. Nakamura, Y., Nakamura, K., Matsumura, K., Kobayashi, S., Kaneko, T., & Morrison, S. F. (2005). Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *European Journal of Neuroscience*, 22(12), 3137–3146.

70. Nakhate, K. T., Subhedar, N. K., & Kokare, D. M. (2019). Involvement of neuropeptide CART in the central effects of insulin on feeding and body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 181, 101–109.
71. Nillni, E.A., Sevarino, K.A. (1999). The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine Reviews*, 20: 599–648.
72. Niswender, K. D., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (2004). Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 15(8), 362–369.
73. O'Connor y O'Cuinn. (1984). Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *European Journal of Biochemistry*, 144(2), 271–278.
74. O'Dowd, B. F., Lee, D. K., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., ... George, S. R. (2000). TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology*, 14(1), 183–193.
75. Paxinos, G., Franklin, K.B.J. (2013). Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 5th edition, Elsevier.
76. Péterfi, Z., Farkas, E., Nagyunyomi-Sényi, K., Kádár, A., Ottó, S., Horváth, A., ... Fekete, C. (2018). Role of TRH/UCN3 neurons of the perifornical area/bed nucleus of stria terminalis region in the regulation of the anorexigenic POMC neurons of the arcuate nucleus in male mice and rats. *Brain Structure and Function*, 223(3):1329-1341.
77. Portillo-Baquedano, M.P. y Martínez-Hernández, J.A. (2005). Tratado de Nutrición, Tomo 1, Cap. 1.18, Regulación de Balance energético y corporal, Ed. Acción médica.
78. Pronobis, M. I., Deutch, N., & Peifer, M. (2016). The Miraprep: A protocol that uses a miniprep kit and provides maxiprep yields. *PLOS ONE*, 11(8), e0160509.
79. Puga, L., Alcántara-Alonso, V., Coffeen, U., Jaimes, O., & de Gortari, P. (2016). TRH injected into the nucleus accumbens shell releases dopamine

- and reduces feeding motivation in rats. *Behavioural Brain Research*, 306, 128–136.
80. Racotta, I.S., LeBlanc, J., Richard, D. (1994). The effect of caffeine on food intake in rats: involvement of corticotropin-releasing factor and the sympatho-adrenal system. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 48, 887-892.
81. Rezai-Zadeh, K., Yu, S., Jiang, Y., Laque, A., Schwartzburg, C., Morrison, C. D., ... Münzberg, H. (2014). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Molecular Metabolism*, 3(7), 681–693.
82. Rivera-Dommarco, J., et al. (2012). Encuesta nacional de salud y nutrición, INSP.
83. Rivest, S., Richard, D. (1990). Involvement of corticotropin-releasing factor in the anorexia induced by exercise. *Brain Research Bulletin*, 25: 169-172.
84. Rodríguez-Molina, V., Patiño, J., Vargas, Y., Sánchez-Jaramillo, E., Joseph-Bravo, P., & Charli, J.-L. (2014). TRH regulates action potential shape in cerebral cortex pyramidal neurons. *Brain Research*, 1571, 1–11.
85. Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609–625.
86. Sánchez, E., Uribe, R. M., Corkidi, G., Zoeller, R. T., Cisneros, M., Zacarias, M., ... Joseph-Bravo, P. (2001). Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 74(6), 407–422.
87. Seoane-Collazo, P., Fernø, J., González, F., Diéguez, C., Leis, R., Nogueiras, R., & López, M. (2015). Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine*, 50(2), 276–291.
88. Singru, P. S., Sánchez, E., Fekete, C., & Lechan, R. M. (2007). Importance of melanocortin signaling in refeeding-induced neuronal activation and satiety. *Endocrinology*, 148(2), 638–646.
89. Speakman, J. R., & Westerterp, K. R. (2010). Associations between energy demands, physical activity, and body composition in adult humans between



- 18 and 96 y of age. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 92(4), 826–834.
90. Stricker, E. M., Swerdloff, A. F., & Zigmond, M. J. (1978). Intrahypothalamic injections of kainic acid produce feeding and drinking deficits in rats. *Brain Research*, 158(2), 470–473.
91. Sun, Y. (2003). Thyrotropin-releasing hormone receptors -- similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30(2), 87–97.
92. Trapp, S., & Richards, J. E. (2013). The gut hormone glucagon-like peptide-1 produced in brain: is this physiologically relevant? *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 964–969.
93. Ubieta, R., Uribe, R. M., González, J. A., García-Vázquez, A., Pérez-Monter, C., Pérez-Martínez, L., ... Charli, J.-L. (2007). BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway. *Brain Research*, 1174, 28–38.
94. Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Ramírez-Martínez, C., García-Vázquez, A., Romero, F., Cisneros, M., ... Joseph-Bravo, P. (2014). Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology*, 155(5), 2020–2030.
95. Van den Pol, A. N., Acuna-Goycolea, C., Clark, K. R., & Ghosh, P. K. (2004). Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron*, 42(4), 635–652.
96. Varela, L., & Horvath, T. L. (2012). Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Reports*, 13(12), 1079–1086.
97. Webb, P. (1981). Energy expenditure and fat-free mass in men and women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34: 1816–1826.
98. Wei, Q., Krolewski, D. M., Moore, S., Kumar, V., Li, F., Martin, B., ... Akil, H. (2018). Uneven balance of power between hypothalamic peptidergic neurons

- in the control of feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115(40): E9489-E9498.
99. Westerterp K. R. (2017). Control of energy expenditure in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71,340–344.
100. Westerterp, K.R. (2010). Physical activity, food intake and body weight regulation: insights from doubly labeled water studies. *Nutrition Reviews*, 68: 148–154.
101. Whiddon, B. B., & Palmiter, R. D. (2013). Ablation of neurons expressing melanin-concentrating hormone (MCH) in adult mice improves glucose tolerance independent of MCH signaling. *Journal of Neuroscience*, 33(5), 2009–2016.
102. White, J. D., & Kershaw, M. (1990). Increased hypothalamic neuropeptide Y expression following food deprivation. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 1(1), 41–48.
103. Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M. and Larsen, P.R. (1988). *Williams Textbook of Endocrinology*, 9th ed. Ed: Jean D. Wilson et al., Saunders, Philadelphia.
104. Wise, R. A. (2006). Role of brain dopamine in food reward and reinforcement. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1471), 1149–1158.
105. Wu, Q., Lemus, M. B., Stark, R., Bayliss, J. A., Reichenbach, A., Lockie, S. H., & Andrews, Z. B. (2014). The temporal pattern of cfos activation in hypothalamic, cortical, and brainstem nuclei in response to fasting and refeeding in male mice. *Endocrinology*, 155(3), 840–853.
106. Yang, L., Scott, K. A., Hyun, J., Tamashiro, K. L., Tray, N., Moran, T. H., Bi, S. (2009) Role of dorsomedial hypothalamic Neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. *Journal of Neuroscience*, 29(1), 179-90.
107. Yoshida K, Li X, Cano G, Lazarus M, Saper CB. Parallel preoptic pathways for thermo-regulation. *J Neuroscience*, 2009; 29:11954–11964.
108. Yu, J. H., & Kim, M.-S. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes & Metabolism Journal*, 36(6), 391-398.

109. Zárata A, et al (1977) El hipotálamo como glándula de secreción interna, *Gaceta Médica de México*,
110. Zhang, N., Zhang, H.-Y., Bi, S. A., Moran, T. H., & Bi, S. (2019). Differential regulation of thyrotropin-releasing hormone mRNA expression in the paraventricular nucleus and dorsomedial hypothalamus in OLETF rats. *Neuroscience Letters*, 703:79-85.
111. Zhang, X., & van den Pol, A. N. (2012). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) inhibits melanin-concentrating hormone neurons: Implications for TRH-mediated anorexic and arousal actions. *Journal of Neuroscience*, 32(9), 3032–3043.