



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA FRUCTOSA EN EL NÚCLEO ARQUEADO INDUCE HIPERGLUCEMIA;  
IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO DEL SÍNDROME METABÓLICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
CARLOS RICARDO MARTÍNEZ GÓMEZ

TUTOR PRINCIPAL  
RUDOLF BUIJS  
Entidad de adscripción  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

RANIER GUTIÉRREZ MENDOZA  
Entidad de adscripción  
IPN-CINVESTAV

DAVID RICARDO OROZCO SOLIS  
Entidad de adscripción  
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad de México. Junio, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido el esfuerzo de varias personas a quien les estoy enormemente agradecido, junto con este proyecto he crecido y madurado un poco más.

Agradezco enormemente a mis compañeros de laboratorio, especialmente a la Dra. Gabriela Hurtado Alvarado por ayudarme en la realización de diversos experimentos y ser el pegamento que se necesita para el laboratorio; a la estudiante maestría Yenifer Tort por haber compartido este proyecto y seguir sufriendo con el, dejo en buenas manos este proyecto y se que cada día te superas más; al estudiante de servicio social Eduardo Josué Manrique Perera por haber iniciado este proyecto; al estudiante de doctorado Esteban Santacruz por haberme instruido, aconsejado, y ayudado experimentalmente, por brindar ese humor tan particular al laboratorio; a la Dra. Eva Soto Tinoco por apoyar a que todo en el laboratorio funcionara; a la estudiante de doctorada Betty Rodríguez Cortés que a pesar de todo siempre brindo su apoyo y compartimos buenos momentos; finalmente al Dr. Ruud Buijs que sigue siendo el mismo con quien constantemente contraste y algunas veces coincido, por siempre pensar diferente, por hacerme pensar las cosas de la manera correcta y no de la fácil, por siempre enseñarme, criticar y ayudarme a superarme en esta etapa de mi carrera, por ser un excelente jefe de laboratorio e investigador y por haber confiado en mi por todos estos años. También agradezco al resto de los miembros del laboratorio y a los que ya no están.

Agradezco a mi familia, a la familia que se fue y a la familia que comienza. Sin dudas los primeros son mis padres, a quienes amo enormemente, y siempre me han apoyado incondicionalmente, en cada etapa de mi vida me han brindado todo, lo han dado todo por que yo me pueda superar y haya llegado hasta este punto, a usted sin duda les dedico este trabajo y cuando llegue a formar mi propia línea de investigación sabré que fue gracias a ustedes. A mi hermano, que en estos años los dos fuimos más independientes y que las veces que convivimos fueron especiales, los dos ya más maduros y felices de convivir juntos. A mis abuelitos que ya no están, pero dejaron sus enseñanzas atrás, dejaron mucho amor y una gran familia; a mis abuelos que aun están y que aun a su edad siguen experimentando cosas nuevas y cambiando, que me siguen demostrando todo su amor y yo los amo más y agradezco el tiempo juntos. A mi familia que comienza, a mi novio Ale con quien me siento cómodo, feliz, amo y el me ama, quien me enseña cosas nuevas, crecemos y creceremos juntos.

Agradezco a mi Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas con ser mi casa por los últimos siete años de mi vida aproximadamente, espero tener la oportunidad de volver y retribuir a esta gran institución. Agradezco al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, a todos los tutores que me han instruido y acompañado en esta maestría. A los miembros de mi comité académico, al Dr. Ranier Gutiérrez y al Dr. Ricardo Orozco, por su apoyo y sus valiosos consejos en el desarrollo de este proyecto. A los miembros del jurado de grado, por haber corregido ampliamente este trabajo escrito.

Finalmente, agradezco a Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca de maestría, No. CVU 902432.

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>Síndrome Metabólico.....</b>	<b>7</b>
Hipótesis del aumento en la incidencia ECV y SM por la dieta.....	7
<b>Metabolismo Celular.....</b>	<b>8</b>
Efectos de la fructosa sobre la fisiología.....	8
Hipótesis de la señalización por proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la inducción de Ácido Úrico por Fructosa en el hígado. Importancia en el desarrollo de ECV y daño renal.....	9
<b>Regulación de la glucemia.....</b>	<b>10</b>
¿Cómo el SNC detecta la glucemia?.....	10
Mecanismos de transporte del Hipotálamo Medio Basal.....	11
Regulación circadiana del núcleo ARC por el NSQ.....	13
<b>Señalización por fructosa.....</b>	<b>14</b>
<b>PREGUNTA.....</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>17</b>
<b>Animales.....</b>	<b>17</b>
<b>Cirugías.....</b>	<b>17</b>
Canulación de vena yugular.....	17
Implantación de cánula ICV.....	17
Implantación de cánula de microdiálisis en el ARC.....	18
Implantación de Telemetry.....	18
<b>Diseño experimental.....</b>	<b>18</b>
<b>Perfusión y ensayo de permeabilidad.....</b>	<b>19</b>
<b>Inmunofluorescencia contra GLUT1.....</b>	<b>19</b>
<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>Efectos de la administración IV de fructosa sobre la glucemia en dos distintos momentos del día, inicio de la fase de reposo (CT2) y previo a la fase de actividad (CT11). .....</b>	<b>21</b>
La respuesta ante fructosa depende del estado energético del animal.....	22
La respuesta de hiperglucemia no depende de la alta osmolaridad o presión osmótica.....	22
La administración de fructosa no induce respuestas agudas autonómicas (cambio en frecuencia cardiaca o temperatura corporal).....	24
<b>La administración directa de fructosa en el SNC o en el ARC recapitula la hiperglicemia inducida por la administración IV.....</b>	<b>25</b>
<b>La administración de fructosa modifica la BHH de forma aguda; disminuye la penetración de sustancias al ARC y al 3V, disminuye la inmunoreactividad de GLUT1 en los tunicitos, y tiende a disminuir el transporte específico de glucosa al HMB.....</b>	<b>28</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>¿Cómo la fructosa induce cambios en la inmunoreactividad contra GLUT1?.....</b>	<b>36</b>

<b>Activación de gluconeogénesis hepática por fructosa.....</b>	<b>36</b>
<b>¿Qué implicaciones tiene la fructosa en el HMB sobre el desarrollo del SM? .....</b>	<b>36</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>39</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

2DG. 2-desoxiglucosa  
2NBDG. Análogo fluorescente de glucosa  
3V. Tercer ventrículo  
AE. Azul de Evans  
AG. Ácidos grasos  
AgRP. Proteína relacionada con el gen agouti  
AMPK. proteína cinProteína cinasa activada por AMP  
ARC. Núcleo arqueado  
AU. Ácido Úrico  
AUC. Área bajo la curva  
AVP. Vasopresina  
BHE. Barrera hematoencefálica  
BHH. Barrera hemato-hipotalámica  
BNST. Núcleo del lecho de la estría terminal  
BPM. Pulsaciones por minuto  
CPM. Cuentas por minuto  
CT. Tiempo circadiano  
DT2. Diabetes tipo 2  
ECV. Enfermedades Cardiovasculares  
EM. Eminencia media  
ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición  
FRU. Administración de fructosa  
GE. Neurona activada por glucosa  
GI. Neuronas inhibida por glucosa  
GLUT. Transportador de glucosa  
HMB. Hipotálamo medio basal  
ICV. Intracerebroventricular  
IV. Intravenosa  
KHK. Cetohehexocinasa  
LDL. Lipoproteína de baja densidad  
MAN. Administración de manitol  
MDA. Microdiálisis en el ARC  
NPY. Neuropeptido Y  
NSQ. Núcleo supraquiasmático  
OCV. Órgano Circunventricular  
PVN. Núcleo Paraventricular Hipotalámico  
RCR. Respuesta contra-regulatoria  
SM. Síndrome Metabólico  
SNC. Sistema Nervioso Central  
SON. Núcleo Supraóptico  
TAB. Tejido Adipsos Blanco  
TG. Triglicéridos  
VEH. Administración de vehículo  
VL. Ventrículo lateral  
VLDL. Lipoproteína de muy baja densidad  
VMH. Núcleo ventromedial hipotalámico  
ZT. Zeitgeber  
 $\alpha$ -MSH. Hormona estimulante de melanocitos alfa  
 $\mu$ D. Microdiálisis

## RESUMEN

Actualmente en México, las enfermedades cardiovasculares (ECV) y la diabetes (DT2) son las principales causas de mortalidad. La incidencia de estas patologías se ha acrecentado debido al consumo elevado de carbohidratos simples, particularmente productos con altos niveles de fructosa. De manera crónica, las dietas altas en fructosa son capaces de desarrollar síndrome metabólico (SM), patología asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar ECV y DT2. De los principales signos clínicos del SM son la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina, lo cual sugiere que la regulación de la glucemia se encuentra alterada. El núcleo arqueado (ARC) junto con el núcleo ventromedial (VMH) (la región del hipotálamo medio basal (HMB)) son centros encargados de detectar la glucosa circulante y montar una respuesta contra regulatoria (RCR) ante la hipoglicemia. Recientemente, describimos que el transporte de glucosa sanguínea al ARC presenta un ritmo circadiano mediado por la expresión rítmica de GLUT1 y la modificación de la barrera hemato-hipotalámica (BHH), este ritmo en el transporte de glucosa presenta una relación inversa con la glucemia. En el presente trabajo, evaluamos el efecto agudo de la administración de fructosa sobre el transporte de glucosa al ARC y la activación de una RCR. Observamos que solo cuando el transporte circadiano hacia el HMB es mayor, la administración de fructosa (intravenosa, intracerebroventricular o directamente en el HMB) induce hiperglicemia transitoria. Además, la administración intravenosa de fructosa disminuye rápidamente el transporte de sustancias al HMB, la inmunoreactividad contra GLUT1 en tancitos y una tendencia a un menor transporte de glucosa hacia el HMB. Estos resultados señalan que la fructosa modifica el transporte de sustancias y de glucosa hacia el HMB de forma aguda dependiendo de la hora del día, sugiriendo que parte de los efectos observados con dietas altas con fructosa y el desarrollo de SM se deban a la modificación de la BHH.



# INTRODUCCIÓN

## *Síndrome Metabólico*

El Síndrome Metabólico (SM) es un conjunto de anormalidades metabólicas que incluye a la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la obesidad, la dislipidemia, la hipertensión, entre otras; que acrecientan el riesgo de desarrollar de Enfermedades Cardiovasculares (ECV) (**Eckel 2005**). Se han propuesto diferentes definiciones y criterios de diagnóstico por organizaciones como la OMS, sin embargo, a pesar de que dichas definiciones se han modificado varias veces, se ha resaltado a la resistencia a la insulina y la consecuente intolerancia a la glucosa como centrales en el desarrollo del SM (**Eckel 2005, Xu 2019**).

La obesidad y el sobrepeso son una de las principales condiciones de la población en riesgo de desarrollar SM, ECV y diabetes. La prevalencia de obesidad en EUA es alta, alrededor de un tercio de la población es obesa (**Xu 2019**), mientras que, en la población mexicana, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 (ENSANUT 2020; **Shamah-Levy 2021**), se estima en un 74% la prevalencia de obesidad y sobrepeso en población adulta. En México se estima la prevalencia en adultos de diabetes en 15.7% y de hipertensión en 30% (**Shamah-Levy 2021**), además, según la definición que se utilice, se estima la prevalencia de SM en un 50% en adultos en México (**Pedroza-Tobias 2014**); por otro lado, en EUA se estima en un 34% en adultos (**Aguilar 2015**). Una de las definiciones más actuales de este síndrome incluye el aumento de la circunferencia de la cintura (obesidad abdominal) ponderada con la etnicidad como uno de los cinco criterios de diagnóstico, pero excluye a la obesidad como otro (**Alberti 2009**). Por lo que es de vital importancia el correcto diagnóstico del SM, ya que el riesgo relativo comparado con una población sin SM de desarrollar otros padecimientos como Diabetes tipo 2 (DT2) es desde 3 a 5 veces más y para ECV es de 2 hasta 4 veces más (**Després 2006; Ford 2008; Shin 2013; Stern 2004; Xu 2019**).

## *Hipótesis del aumento en la incidencia ECV y SM por la dieta*

En el caso de EUA, a partir de inicios del siglo XX la incidencia y mortalidad por ECV aumentó exponencialmente (**Go 2013**). Actualmente en México se reconoce que una de las principales causas de mortalidad son enfermedades del corazón (con un 20.1%) y diabetes (con un 13.9%) (**INEGI 2021**). Históricamente, a mediados del siglo XX surgieron dos hipótesis que correlacionaban un cambio en la dieta con la creciente incidencia de ECV (**Yudkin 1957**), por un lado, un aumento en el consumo de grasa (**Keys 1975**), y por otro lado el aumento en el consumo de carbohidratos simples p. ej. azúcar de mesa (**Yudkin 1963; Yudkin 1964**). En los años 70s había incredulidad sobre la hipótesis del consumo de carbohidratos simples debido a reportes que la invalidaban (**McGandy 1967**) los cuales fueron particularmente financiados por la industria azucarera (**Kearns 2017; Pett 2017**), de hecho, el crecimiento en la incidencia de las ECV coincide con el desarrollo de la industria azucarera y del consumo del azúcar de mesa a mediados del siglo XX (**Johnson 2007**). En la época de los 90s a 2000s se acrecentó la evidencia experimental a favor de que la dieta alta en carbohidratos simples, particularmente dietas altas en fructosa, promovía el desarrollo de SM y ECV (consultar la sección “*Efectos de la fructosa sobre la fisiología*”; para una revisión más extensa **Lê 2006; Temple 2018**). Por el otro lado, actualmente se sabe que las grasas saturadas pueden inhibir la producción endógena de glucosa (**Lam 2005b; Lam 2005c; Li 2020**), lo cual no concuerda con la intolerancia a la glucosa observada en personas con SM o DT2.

Finalmente, en México según la ENSANUT los alimentos más consumidos no recomendados por instituciones de la salud son bebidas endulzadas, llegando a ser consumidos por más del 80% de la población tanto adulta como joven (**INEGI-INSP 2019; Shamah-Levy 2021**). Recientemente un

estudio señaló que el riesgo de mortalidad por ECV es mayor cuando la dieta consumida tiene un alto índice glucémico (la glucemia postprandial de un cierto alimento p. ej. bebidas endulzadas, con referencia a la ingesta glucosa) (**Jenkins 2021**).

### **Metabolismo Celular**

El azúcar de mesa o sacarosa es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa, las cuales son hexosas, carbohidratos simples de seis carbonos, cuya única diferencia es un grupo funcional, una cetona en el caso de la fructosa o un aldehído en el caso de la glucosa. El inicio de su metabolismo requiere de un transportador membranal, GLUT, y en el caso de la glucosa se requiere de GLUT1, 2, 3 o 4, mientras que en el caso de la fructosa se requiere de GLUT2, 5 u 8. Es importante mencionar la absorción de fructosa, los enterocitos del tracto intestinal absorben entre el 60-50% de la fructosa ingerida (a través de GLUT5 (**Hannou 2018**)) la cual pasa al sistema porta hepático donde alrededor del 67% es absorbida y metabolizada por el hígado, la restante pasa a la circulación sanguínea donde tiene una vida media de entre 30 a 100 minutos (**Le 2012; Sugimoto 2010; Villegas 2018**). El segundo paso de su metabolismo celular es su fosforilación y tanto la glucosa como la fructosa son sustratos de diferentes hexocinasas, la glucosa es sustrato preferente de la glucocinasa, mientras que la fructosa es sustrato preferente de la fructocinasa, también llamada cetohexocinasa (KHK). En contraste a las otras hexocinasas, las cuales fosforilan en posición 6, la fructocinasa fosforila a la fructosa en la posición 1, generando fructosa-1-fosfato. Los sustratos fosforilados en la posición 6 son metabolizados por la enzima fosfofructocinasa 1 la cual es altamente regulada tanto hormonal como alostéricamente, en cambio los sustratos fosforilados en la posición 1 saltan por completo esta regulación y pasan directamente a la glucólisis (**Hannou 2018**).

Aunado a esto, la glucosa y la fructosa se pueden interconvertir por medio de la vía del poliol o sorbitol, donde se requiere de dos enzimas: aldosa reductasa que reduce la glucosa a sorbitol y sorbitol deshidrogenasa que oxida el sorbitol a fructosa. Una vez fosforilado, la fructosa es directamente procesada a gliceraldehído y dihidroxiacetona-P por la aldolasa B, y en el caso de la glucosa sigue la vía clásica de la glucólisis.

### **Efectos de la fructosa sobre la fisiología**

La administración aguda de fructosa induce secreción de insulina, uricemia, liberación de hormona antidiurética también llamada vasopresina (AVP), aumento en la presión arterial y ritmo cardiaco (**Brown 2008; Fox 1972; Stirpe 1970; Wolf 1992**). También hay aumento en la glucemia, el lactato y disminuye la concentración de ácidos grasos circulantes (AG) (**Gaysinskaya 2011; Schwarz 1992; Wolf 1992**). De forma crónica, las dietas altas en sacarosa o fructosa inducen resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (**Cohen 1964, 1972; Martinez 1994; Reaven 1979; Stanhope 2009; Taghibiglou 1999; Zavaroni 1980**). Específicamente, se ha encontrado en el hígado un aumento en la producción de triglicéridos (TG), AG, colesterol, lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) (**Cohen 1964; Li 2018; Martinez 1994; Reaven 1979; Softic 2017; Stanhope 2009; Taghibiglou 1999; Zavaroni 1980**), igualmente genera resistencia a la insulina en el hígado (**Faeh 2005; Schwarz 2015; Softic 2017; Softic 2020**); importantemente estos efectos se han observado en roedores, perros y humanos. Este aumento en AG y TG promueve el crecimiento del tejido adiposo blanco (TAB) en la cavidad visceral (**Després 2006; Jurgens 2005; Stanhope 2009**). Además, las dietas altas en sacarosa o fructosa generan hipertensión (**Buñag 1982; Martinez 1994**) y aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno en tejido cardiaco (**Delbosc 2005**). Como se describirá más adelante, se ha señalado una vía por la cual la fructosa induce aumento en la uricemia y AVP, lo cual junto con la dislipidemia y la hipertensión es central en el desarrollo ECV y daño renal. Sin embargo, a pesar de que la fructosa es capaz de desarrollar los cambios metabólicos del SM aun no existe un consenso en el mecanismo que explique este proceso, se desarrollará este tema en la siguiente sección.

## **Hipótesis de la señalización por proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y la inducción de Ácido Úrico por Fructosa en el hígado. Importancia en el desarrollo de ECV y daño renal.**

En hígado, la ingesta de fructosa se ha encontrado que induce una menor actividad de AMPK (**Li 2018**). Esta enzima, AMPK, se activa con niveles energéticos bajos o al existir un aumento en el AMP intracelular; su principal función es modificar el metabolismo celular donde uno de sus blancos de regulación es la inhibición de acetil CoA carboxilasa, enzima clave en la síntesis de AG (**García 2017**). Al estar disminuida la actividad de la AMPK, durante el consumo de una dieta alta en fructosa, se explica el aumento en la síntesis de AG, TG y LDL en el hígado, condición conocida como hígado graso o esteatosis hepática (**Li 2018**). En este aspecto, se ha encontrado que durante el consumo de fructosa la activación constitutiva de AMPK específica en el hígado confiere resistencia a los efectos de la dieta sobre la esteatosis hepática (**Woods 2017**).

La fructosa logra disminuir la actividad de AMPK en el hígado debido a la actividad de la fructocinasa. Debido a la fosforilación desregulada de la fructosa, la demanda de fosfato intracelular es mayor, esto induce que enzimas que participan en la degradación de nucleótidos, como la AMP-deaminasa hepática, se activen (**Cicerchi 2014; Nakagawa 2005**). Esta enzima ayuda en la degradación de AMP a finalmente fosfatos y ácido úrico (AU). El AU es uno de los metabolitos que se observan rápidamente en circulación después de la ingesta de fructosa (**Fox 1972; Stirpe 1970**) y es central en la producción hepática de AG, TG, y además de la insensibilidad a la insulina inducidos por fructosa, ya que la inhibición farmacológica de la degradación de AMP a AU revierte los efectos de la dieta con fructosa (**Lanaspa 2012; Sanchez-Lozada 2019; Nakagawa 2006**). Aunado a esto, el AU por sí solo aumenta la concentración de fructosa en el hígado a través del aumento de la vía del sorbitol, lo cual genera un asa de retroalimentación positiva (**Sanchez-Lozada 2019**). Se ha observado en pacientes con DT2 la presencia de una mayor cantidad de sorbitol circulante indicando una mayor actividad de la vía del sorbitol (**Preston 2010**). Esta hipótesis también se apoya en la observación de la mutación de la uricasa en homínidos (**Kratzer 2014**) la cual realiza la función de oxidar el AU en el hígado y finalmente generar otros productos de degradación, sin embargo, la mutación ocasiona que los humanos sean más susceptibles a desarrollar hiperuricemia ya que el AU se acumula; de hecho, la hiperuricemia se observa en pacientes con DT2, obesidad y SM (**Huang 2016; Kuwabara 2017; Nakagawa 2005, 2006; Zong 2020**).

Por otro lado, como se ha mencionado, la fructosa induce liberación de la hormona antidiurética o AVP (**Wolf 1992**) lo cual se correlaciona con daño renal y finalmente efectos cardiovasculares (**García-Arroyo 2017; Roncal Jimenez 2013**). De manera fisiológica, la AVP es una hormona secretada por el sistema nervioso central (SNC), particularmente es producida por neuronas mangnocelulares en el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON) del hipotálamo. Estos núcleos son sensores de presión osmótica, se activan cuando la osmolaridad sanguínea es mayor a 300 mOsm, p. ej. deshidratación, liberando AVP a la circulación, señal que en el riñón permite retener agua y diluir el plasma sanguíneo (**Bourque 2008**). Durante la deshidratación, la señalización de AVP en el riñón activa la vía del sorbitol y aumenta localmente la concentración de fructosa y AU lo cual ocasiona daño renal (**García-Arroyo 2017; Roncal Jimenez 2013**). Igualmente, el SON posee enzimas para procesar fructosa y, similar al riñón, durante la deshidratación aumenta los niveles de fructosa y de su síntesis en el hipotálamo (**Song 2016**). Interesantemente, una dieta alta en sal, que genera deshidratación, induce en el hígado aumento en la vía del sorbitol y la generación de fructosa que a través de la fructocinasa induce hígado graso y SM (**Lanaspa 2018**). Esto sugiere que, tanto en la deshidratación como durante el consumo elevado de fructosa, AVP, inducido por fructosa, retroalimenta positivamente la producción de fructosa, lo cual en el hígado, debido a la actividad de la fructocinasa, induce la producción de AU, que junto con AVP generan daño renal; de hecho, en *Drosophila* una dieta alta en sacarosa induce los mismos mecanismos (aumento de uricemia y daño renal por formación de cálculos renales) los cuales se pueden revertir aumentando el consumo de agua, es decir, disminuyendo la deshidratación (**Van Dam 2020**).

En contraste a estos estudios, se ha observado que desarrollar hiperuricemia aguda (por menos de un día) con dieta, no genera cambios ni en la glucemia o la sensibilidad a insulina (**Coelho 2020**). Como se ha señalado anteriormente, un transgénico con activación constitutiva de AMPK en el hígado es resistente a desarrollar hígado graso por una dieta alta en fructosa, sin embargo, sí desarrollan intolerancia a la glucosa (**Woods 2017**) lo cual sugiere que la dislipidemia y la intolerancia a la glucosa no comparte el mecanismo mediado por AMPK hepática. A pesar de esto, recientemente se observó que la delección específica del gen *khk* en el hígado prevenía los efectos sobre la intolerancia a la glucosa y la dislipidemia (**Andres-Hernando 2020**). Estos estudios señalan que el metabolismo de fructosa por el hígado es central para la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, sin embargo, no es un mecanismo mediado por AMPK hepática. Por ello, el mecanismo de fructosa-UA-AMPK probablemente explicaría parte de los efectos observados en el SM, como son los cardiovasculares o la dislipidemia (**Softic 2020**), pero la evidencia directa de este mecanismo sobre la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa a nivel organismo es aun controversial.

Con base en lo anterior, es necesario entender los mecanismos fisiológicos sobre la regulación de la glucemia, ya que a pesar de ser el hígado el órgano que contiene las reservas energéticas, particularmente las reservas de glucosa, no actúa solo y requiere tanto de hormonas como la integración del SNC y la salida del sistema nervioso autónomo para regular sus funciones. En este aspecto, son muchos los grupos de investigación que han mirado al SNC cómo importante tanto en el desarrollo como el mantenimiento del SM.

### **Regulación de la glucemia**

El SNC participa en la regulación de la concentración de glucosa en sangre debido a ser la principal fuente de energía de este sistema. Se cree que evolutivamente fue más ventajoso depender de la oxidación de glucosa que de la oxidación de ácidos grasos (AG) (**Schonfeld 2013**), a pesar de que, energéticamente hablando, de un mol de AG se obtiene mayor cantidad de ATP, se requiere mayor cantidad de oxígeno para obtener la misma cantidad de ATP que un mol de glucosa. Esto se debe a que en la  $\beta$  oxidación se produce una tasa FADH<sub>2</sub>/NADH de 0.5 (el FADH<sub>2</sub> produce menor cantidad de ATP que el NADH) mientras que esa misma tasa para el ciclo de Krebs es de 0.2. Este aumento necesario en el consumo de oxígeno debido a oxidación de AG hace que se produzca mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno y mayor probabilidad de daño y muerte celular (**Kajihara 2017; Schonfeld 2013; Zhao 2019**). Es más ventajoso para el SNC reducir la probabilidad de especies reactivas de oxígeno a costa de un cambio en la dieta energética (**Schonfeld 2013**). Es así como tanto el SNC como órganos periféricos detectan la hipoglucemia y montan respuestas contra-regulatorias (RCR) promoviendo la liberación de hormonas como adrenalina, glucagón y corticosterona con el fin de aumentar la concentración de glucosa en sangre (**Eigler 1979; Salavert 1982**).

#### **¿Cómo el SNC detecta la glucemia?**

Se sabe que la administración en los ventrículos cerebrales de sustancias hipoglucemiantes ocasionan una RCR e induce hiperglucemia (**Herrera-Moro 2016; Yamamoto 1983**), esto indica que el SNC es capaz de detectar los niveles de glucosa. Dentro del SNC, existen por lo menos dos tipos de neuronas capaces de despolarizarse debido a cambios en la glucosa del medio, las neuronas inhibidas por glucosa (GI) y las neuronas activadas por glucosa (GE). Estas neuronas detectan tanto cambios en NAD<sup>+</sup> citoplásmico como cambios en el ATP (**Kurita 2015; Poci 2005; Song & Routh 2016; Yang 1999**), sin embargo, existe controversia sobre las proteínas que les permiten detectar estos cambios (para una revisión más completa **López-Gambero 2018; Thorens 2022**). Dentro de los núcleos que poseen estas neuronas, se encuentran núcleos en el tallo cerebral y núcleos en el hipotálamo, principalmente (**Thorens 2022**). Los núcleos en el tallo cerebral se comunican

ampliamente con el hipotálamo, particularmente con el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH), tal es el caso del núcleo parabraquial (PBN), que contiene neuronas GI que se activan por hipoglucemia, las cuales son capaces de promover una RCR mediante la liberación de adrenalina, glucagón y corticosterona debido a su proyección con el VMH (**Garfield 2014**).

El VMH también cuenta con neuronas GI que se activan por hipoglucemia (**Hirschberg 2020; Routh 2010**) que proyectan al núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) lo cual estimula la liberación de corticosterona, glucagón y promueve el aumento en la glucemia (**Faber 2018; Meek 2015**). Otro núcleo dentro del hipotálamo capaz de detectar la glucemia es también el núcleo arqueado (ARC) el cual junto al VMH forman la región medio basal del hipotálamo (HMB). El ARC contiene neuronas GE y GI; además presenta poblaciones características de neuronas que regulan el apetito, orexigénicas y anorexigénicas, que promueven el apetito o la saciedad, respectivamente, las cuales reciben rápida información sensorial de la presencia de comida (**Chen 2015**). Las neuronas orexigénicas, además de promover la ingesta de alimento, pueden disminuir la temperatura, aumentar la glucemia y se ha sugerido que pueden aumentar corticosterona (**Shi 2013; Xu 2018**); las neuronas anorexigénicas promueven la saciedad y el aumento en el gasto energético (**Balthasar 2005; Fenselau 2017; Guzmán-Ruiz 2015**). Las neuronas del ARC se pueden distinguir por los neuropéptidos que liberan, las neuronas orexigénicas liberan Neuropéptido Y (NPY) y proteína relacionada con el gen agouti (AgRP) (**Hahn 1998**), mientras que las neuronas anorexigénicas liberan hormona estimulante de melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH) y el transcrito por cocaína y anfetamina (CART) (**Elias 1998; Vrang 1999**). Se ha observado que una parte de las neuronas AgRP+ del ARC son GI y, a pesar de aun estar en debate (**Ibrahim 2003; Wang 2004; Parton 2007**), se ha demostrado que las neuronas GE son estimuladas por la  $\alpha$ -MSH (**Wang 2004**).

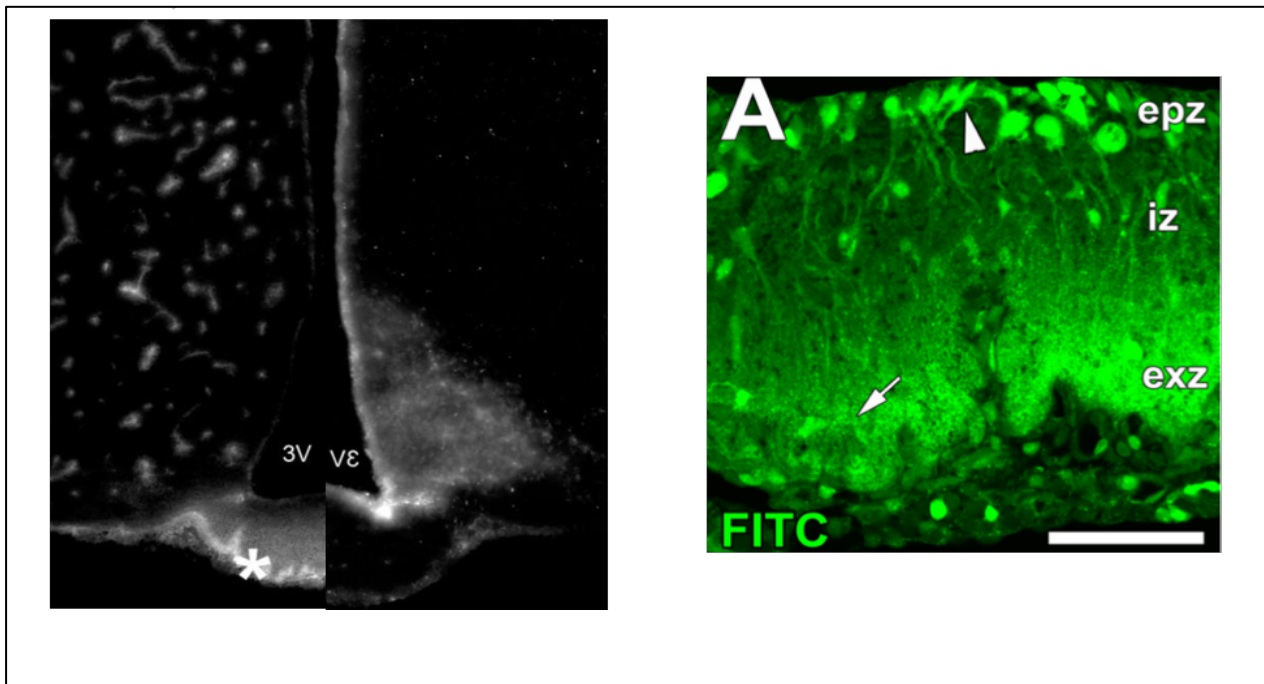
Lesiones del HMB tanto físicas como químicas (con un análogo tóxico de glucosa) generan un aumento en la ingesta de alimento, obesidad, hiperglucemia y resistencia a la insulina (**King 1988; Homma 2006; Blair 1994, 1996**). La lesión química induce un decremento de ambas poblaciones del ARC,  $\alpha$ -MSH + y AgRP/NPY+; sin embargo, las neuronas AgRP/NPY+ se recuperan a las pocas semanas, lo cual sugiere que la recuperación de las neuronas GI del ARC y la pérdida de neuronas  $\alpha$ -MSH + induce SM (**Homma 2006**). En este sentido, se ha encontrado que la administración directa en el ARC de agentes hipoglucemiantes y la activación de neuronas AgRP/NPY+ son capaces de generar una fuerte hiperglucemia, sugiriendo que la activación de neuronas AgRP/NPY+ es central en el desarrollo de SM (**Herrera-Moro 2016; Xu 2018**). En cuanto a su señalización, las neuronas GI del HMB requieren de la activación de AMPK para la liberación de NPY (**Murphy 2009a; Murphy 2009b; Shimizu 2018**). La activación de AMPK en el HMB promueve gluconeogénesis, liberación de glucagón y adrenalina (**Fioramonti 2010; McCrimmon 2008**).

Esta respuesta fisiológica es vital en momentos como el ayuno donde se requiere de un mayor control de la glucemia, es así como tanto la sensibilidad como la actividad de estos núcleos se encuentra aumentada (**Murphy 2009b; Becskei 2008**). A pesar de esto, sorprendentemente es en estas condiciones que el HMB, particularmente el ARC, recibe la mayor cantidad de glucosa (**Langlet 2013a**) lo cual indicaría una disminución en la actividad de neuronas GI, sin embargo, no es lo que se observa (**Becskei 2008**). A continuación, se hablará de los mecanismos de transporte de sustancias de la circulación hacia el HMB como principal regulador de las funciones del HMB.

### **Mecanismos de transporte del Hipotálamo Medio Basal**

El ARC se encuentra adyacente a la eminencia media (EM) y en contacto con el tercer ventrículo. Esta localización facilita la entrada de sustancias desde la circulación sanguínea, ya que la EM es un Órgano Circunventricular (OCV). Los OCV son llamados así debido a su proximidad con los ventrículos cerebrales (**Hofer 1958**), además de presentar (1) capilares fenestrados, (2) una limitada barrera hematoencefálica (BHE) y (3) una barrera hemato-ventricular (**Langlet 2013b**). Se conocen como las “ventanas del cerebro” (**Sisó 2010**) ya que permiten la comunicación directa entre las sustancias sanguíneas y el parénquima cerebral. La EM en complejo con la porción ventromedial

del ARC presenta una extravasación de sustancias sanguíneas y, por lo tanto, el ARC presenta características de un OCV sensorial (Ciofi 2011, Langlet 2013a; Morita 2013; Mullier 2010) (Fig. Introducción 1).



**Figura Introducción 1. Complejo ARC-EM**

Del lado izquierdo se muestra al complejo ARC-EM, en su parte izquierda se muestra la penetración de un colorante administrado intravenoso (IV) y del lado derecho el mismo colorante administrado intracerebroventricular (ICV). Se puede observar la presencia de la BHH ya que las sustancias no penetran de la circulación al tercer ventrículo (3V). Igualmente, las sustancias que penetran del 3V al ARC no penetran a la EM. (Modificado de Mullier 2010).

Del lado derecho se observa la internalización de un colorante administrado IV por los tanicitos que yacen en el piso del 3V en la EM. (Extraído de Morita 2013).

Además de su papel como órgano sensorial, la EM es importante para la secreción de hormonas hipofisiotrópicas. Estas hormonas se liberan en el espacio pericapilar de los vasos fenestrados, viajando a través del sistema porta hipofisiario para llegar a la adenohipófisis. Una vez en la adenohipófisis promueven la liberación de las hormonas hipofisiarias, las cuales actúan sobre una glándula endocrina modificando su fisiología. Este tipo de regulación se conoce como Eje Hipotálamo-Pituitaria-Órgano blanco. Las células epndimogliales de la EM, llamadas tanicitos, juegan un papel importante en la regulación de la liberación de hormonas hipofisiotrópicas (Prevot 2018). Estas células tienen una prolongación que se proyecta a los vasos sanguíneos fenestrados, la cual se modifica para permitir o bloquear la liberación de hormonas (Müller-Fielitz 2017; Prevot 2003).

El área de la detección de sustancias por este complejo es un campo creciente y controversial, existe evidencia de un transporte regulado y de difusión simple a través de los capilares fenestrados de la EM. En el caso del primero, las sustancias son transportadas desde la EM hacia los cuerpos de los tanicitos que yacen en el piso ventricular de la región infundibular del tercer ventrículo. Este es el caso de hormonas como la leptina, la cual es una hormona proteica secretada por el TAB y regula fuertemente la actividad de las neuronas  $\alpha$ -MSH+ y AgRP+ (Caron 2018; Cowley 2001). El estudio de esta hormona rápidamente llamó la atención ya que la delección del gen de leptina o de su receptor ocasionaban una obesidad desmesurada (Elmqvist 2005; Grosbellet 2015). El rápido desarrollo del área señaló que la leptina en el ARC se requiere para mantener el control de la

glucemia, peso, saciedad y adiposidad (**Elmquist 2005; Fujikawa 2015; Grosbellet 2015; Xu 2018**). Actualmente se reconoce el papel de los tanicitos en el transporte específico de esta hormona (**Balland 2014**), los cuales expresan y requieren de la señalizan a través del receptor de leptina para transportarla (**Duquenne 2021; Yoo 2019**). La retroalimentación de leptina hacia el ARC requiere del correcto estado de la EM, si hay fallos en el recambio de células necesarias para el mantenimiento de las proyecciones en esta región, la señalización de leptina se impide y genera obesidad (**Djogo 2016**). Otro caso similar es el transporte de insulina, donde se ha demostrado que el transporte tanicitario vía el receptor de insulina hacia el ARC es esencial para la función de la hormona en el control de la glucemia, y la ausencia del receptor en estas células genera resistencia a la insulina e insensibilidad a otras hormonas en las neuronas AgRP+ (**Porniece Kumar 2021**). Un grupo de trabajo señaló que la activación optogenética de tanicitos podía estimular la actividad de neuronas tanto  $\alpha$ -MSH+ como AgRP+ sin necesariamente transportar una hormona (**Bolborea 2020**).

Además, este transporte regulado no solo se observa en el caso de hormonas de gran peso molecular, sino también en el caso de moléculas de bajo peso como la glucosa. La glucosa es transportada desde la EM hacia el ARC mediante transportadores (GLUT). Se ha observado que la disminución de GLUT en los tanicitos es suficiente para disminuir el transporte de glucosa al tercer ventrículo (**Martínez 2019**). Una vez que llega al ventrículo, los tanicitos se activan por glucosa, independientemente de su metabolismo, y promueven ondas de calcio que se propagan intracelularmente (**López-Gambero 2018; Frayling 2011**). Estas células metabolizan la glucosa a lactato y lo transportan a las neuronas del ARC a través de transportadores de lactato (**Elizondo-Vega 2015; Lam 2005a; Lhomme 2021**). Una vez que el lactato o la glucosa entran al ARC se metabolizan en neuronas produciendo ATP, lo cual activa a neuronas GE o  $\alpha$ -MSH+ (**Fioramonti 2004; Lhomme 2021; López-Gambero 2018; Wang 2013**) e inhibe a neuronas GI o AgRP+ (**Kurita 2015**); por lo tanto, la actividad de las neuronas del ARC está influida por la eficiencia del transporte de glucosa de los tanicitos.

Por otro lado, el transporte regulado no descarta la vía de acceso por difusión simple. Los vasos fenestrados que yacen en la EM permiten la libre difusión de sustancias al parénquima del ARC (**Ciofi 2011; Mullier 2010**). Sin embargo, existe una Barrera Hemato-Hipotalámica (BHH) la cual limita el paso de las sustancias que entran a través de la EM hacia el parénquima del ARC (**Rodríguez 2005; Yulyaningsih 2017**) y se localiza en la interfaz entre la EM y el ARC; es aquí donde colorantes como el Azul de Evans pueden permear al interior del ARC (**Ciofi 2011; Mullier 2010**). Se han descrito cambios en la penetración de sustancias hacia el ARC que dependen del estado de energético, cuando los animales son ayunados la BHH es más permeable y las sustancias pueden penetrar más hacia el ARC (**Langlet 2013a**). Además, también durante el ayuno se modifica el transporte mediado por receptores, ya que aumenta el transporte de sustancias como leptina y facilita su señalización, aumentando la sensibilidad del ARC (**Langlet 2013a**) sugiriendo que tanto el transporte mediado por receptores como la difusión simple de sustancias es regulada y dinámica. Este reporte sugiere que, en contraste con lo descrito en la sección anterior, la actividad del ARC depende importantemente de la eficiencia en el transporte de sustancias. En nuestro grupo de trabajo, se ha reportado cambios en el transporte de sustancias de manera circadiana, teniendo la mayor permeabilidad durante la fase de reposo (**Rodríguez-Cortés 2017**), hemos caracterizado como este proceso es regulado por el reloj central, el núcleo supraquiasmático (NSQ) (**Rodríguez-Cortés 2022**).

### **Regulación circadiana del núcleo ARC por el NSQ**

El NSQ es un pequeño núcleo hipotalámico central en el establecimiento de los ritmos biológicos, la lesión del NSQ evita la presencia de ritmos circadianos de: glucemia, insulina, temperatura corporal, actividad locomotora, frecuencia cardiaca, entre otros; lo que se conoce como asincronía (**Refinetti 1995; Sano 1995; Scheer 2004; Yamamoto 1987**). Incluso se ha observado su importancia en organizar conductas estereotipadas de manera anticipada p. ej. durante el final de

la fase actividad se aumenta la ingesta de agua (**Gizowski 2016**) o al iniciar la fase de actividad aumenta la agresividad (**Todd 2018**). La coordinación con el medio ambiente, la organización de los ritmos circadianos son la manera de organizar a la fisiología conforme a los ciclos de luz:oscuridad, gracias a esta coordinación se ponderan respuestas al momento del día (**Buijs 2019**).

El NSQ puede anticipar los ciclos de luz:oscuridad debido a que es un oscilador que presenta un ritmo autónomo de actividad, y comunica al resto de los núcleos mediante la producción y secreción de neurotransmisores como AVP o péptido vasoactivo intestinal (VIP) (**Kalsbeek 1995; Ono 2017; Schwartz 1985; Shan 2020**). La función principal del NSQ es sincronizar al cerebro imponiendo su temporalidad endógena (**Buijs 1996, 2013**). A pesar de ser un reloj endógeno, el NSQ recibe información sensorial de la retina y se sincroniza a la luz (**Hannibal 1997; Hattar 2006**) manteniendo un ritmo de actividad diurno (mayor actividad durante la fase de luz). Se conoce cómo Zeitgeber (ZT) a los sincronizadores ya que el NSQ no solo recibe información de la luz, sino también p. ej. de la alimentación. Cuando los animales se encuentran en oscuridad constante se toma el final de la fase de actividad locomotora como el inicio de la fase de luz relativa o reposo, en estas condiciones se utiliza el tiempo circadiano (CT).

Cómo se ha mencionado, el NSQ regula la glucemia de manera circadiana, es decir, organiza la fisiología para mantener niveles altos o acrofase durante la fase de actividad diaria y niveles bajos durante el reposo. Este mismo ritmo se observa también en la gluconeogénesis y un ritmo opuesto en las reservas de glucógeno hepático (**Cailotto 2008; Kida 1980; Koronowski 2019; Lamia 2011; Salgado-Delgado 2008**). A nivel organismo, se ha observado que la acrofase de glucemia coincide con el momento de menos resistencia a la insulina (**Aparicio 1974; Carroll 1973; Jarrett 1969; la Fleur 2001; Whichelow 1974; Zimmet 1974**).

Ahora bien, el NSQ también regula fuertemente la entrada de glucosa al ARC, esto lo logra a través de proyecciones de AVP a los tanicitos del tercer ventrículo (**Rodríguez-Cortés 2022**). Estas proyecciones facilitan la entrada de sustancias en la fase de reposo cuando el NSQ es más activo, y lo hace modificando tanto la estructura de la BHH como el transporte específico de glucosa. Particularmente se observó en tanicitos que el transporte de glucosa mediado por GLUT1, transportador que presenta una elevada expresión en tanicitos (**García 2001**), presenta un ritmo circadiano que regula el transporte de glucosa hacia el ARC (**Rodríguez-Cortés 2022**). Funcionalmente, se demostró que este transporte era central en la regulación del ritmo de glucemia, cuando el ARC presentaba un mayor transporte de glucosa (debido a la liberación de AVP del NSQ), los niveles de glucemia eran bajos; y cuando se inhibía el transporte mediado por GLUT1 o la señalización de AVP, aumentaba la glucemia. Estos mecanismos podrían ser sensibles a cualquier agente que se encuentre en la circulación, y como hemos visto la fructosa es capaz de modificar la fisiología celular ¿cuáles son sus efectos a nivel central? ¿La fructosa podría afectar el transporte de sustancias y de glucosa al ARC?

### **Señalización por fructosa**

Como hemos mencionado, se sabe que la fructosa es capaz de desarrollar y de mantener por sí sola el SM. A manera de resumen, en el hígado debido a la vía de fructocinasa y AMP-deaminasa disminuye la actividad de AMPK y aumenta el AU. Esto estimula la síntesis de AG, TG, LDL y promueve el daño renal, pero no necesariamente explica el aumento en la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina. Por otro lado, el SNC es esencial en regular la glucemia, una perturbación en estos mecanismos es capaz de generar SM. Particularmente existen regiones en el cerebro capaces de detectar glucosa y montar una RCR, y en este aspecto poco se ha estudiado el papel de la fructosa en los mecanismos centrales de detección de glucemia.

Por un lado, la ingesta de una bebida con sacarosa previo a la fase de actividad aumenta la orexia, disminuye la glucosa a nivel central, y aumenta la expresión de NPY en el ARC (**Gaysinskaya 2011**). La administración ICV aguda de fructosa activa la orexia (**Cha 2008**) y de forma crónica



induce gluconeogénesis hepática (**Kinote 2012**), ambos casos involucran la activación de AMPK en el HMB. Interesantemente, la ingesta de fructosa solo en la fase de reposo induce intolerancia a la glucosa que también depende de la activación de AMPK en el HMB (**Faria 2017**). Esto contrasta con la inhibición de la señalización de esta enzima en el hígado y probablemente se deba a la presencia de las enzimas de degradación de nucleótidos en el hígado (AMP-deaminasa) lo cual activa la vía de AU y sorbitol. ¿Cómo la fructosa llega al ARC? Los tanicitos expresan transportadores de fructosa, GLUT5 (**Kojo 2016**) que pudieran transportar la fructosa al ARC y modificar la actividad del núcleo, promoviendo la activación de neuronas AgRP/NPY+. En el trabajo actual quisimos estudiar si la fructosa señala directamente en el ARC e induce una RCR de hiperglicemia, y si esta respuesta depende del transporte circadiano de los tanicitos y puede modificar agudamente el transporte específico de glucosa al ARC.

## PREGUNTA

¿Los efectos de la fructosa sobre la glucemia son influidos por la permeabilidad circadiana del ARC?

## HIPÓTESIS

Debido a la regulación circadiana de la permeabilidad del ARC, la fructosa penetrará más en la fase de reposo y en el ARC disminuirá el transporte de glucosa, lo cual inducirá una respuesta de hiperglicemia.

## OBJETIVOS

1. Observar si los efectos de una administración intravenosa (IV) de fructosa sobre la glucemia dependen de la entrada circadiana de sustancias al ARC, utilizando dos distintos momentos del día, inicio de la fase de reposo/alta penetración al ARC (CT2) y previo a la fase de actividad/baja penetración al ARC (CT11).
  - Debido a que la fructosa presenta efectos hiperosmóticos, evaluar si la respuesta de hiperglicemia depende de la alta osmolaridad o presión osmótica.
  - Para señalar que la respuesta se debe a la activación de la gluconeogénesis y no a la activación de la vía del sorbitol, observar si estos efectos dependen del estado energético del animal mediante un ayuno de 24 horas, donde los niveles de reservas energéticas son bajos.
  - Evaluar si existen otras respuestas autonómicas que pudieran explicar los efectos observados sobre la glucemia, por ejemplo, debido a una activación del sistema nervioso simpático.
2. Evaluar si los efectos de hiperglicemia por fructosa son directos sobre el SNC y sobre el ARC mediante la administración de fructosa intracerebroventricular (ICV) y microdiálisis ( $\mu$ D), respectivamente.
3. Evaluar si la administración de fructosa disminuye la penetración de sustancias al ARC, disminuye la inmunoreactividad de GLUT1 en los tancitos y disminuye la entrada específica de glucosa al ARC.

# MÉTODO

## *Animales*

Los experimentos y la manipulación de los animales se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), la ley de protección animal publicada en Ciudad de México (febrero 2002), y son parte del proyecto aprobado por el CICUAL del Instituto de Investigación Biomédica (Núm. registro 91; “El Horario de alimentación como sincronizador”). Los animales se obtuvieron del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Se usaron ratas macho Wistar de entre 240 a 360g que se albergaron individualmente en cajas de acrílico con alimento y agua ad libitum, teniendo un ciclo de luz:oscuridad 12:12.

## *Cirugías*

### *Canulación de vena yugular*

Se anestesió a los animales con una mezcla 2:1 de Ketamina (Anesket, PiSA, Mexico, 50 mg/kg) - Xilacina (Procin, PiSA, México, 8mg/kg) vía intramuscular. Se implantó una cánula de silicón (0.025in de diámetro interno X 0.047in de diámetro externo X 10 cm de largo, Intech, USA) en la vena yugular derecha, la punta de la cánula se introdujo 3.5cm pretendiendo llegar al atrio derecho del corazón. El resto de la cánula se exteriorizó entre las escápulas y el cuello subcutáneamente con un punzocat 14G. Se llenó la cánula con una mezcla para cánula 7:1:1 de Glicerol (J. T. Baker, USA) - Heparina (PiSA, USA) - Antibiótico (Amphotericin B, Penicillin, Streptomycin; GIBCO, USA). Se dejó en recuperación a los animales entre 5 a 7 días.

Se colocó un chaleco hecho a base de cuero para mantener inmóvil la cánula y para que durante el día experimental se pudiera administrar sustancias de forma remota. Por lo menos 6 horas antes del experimento los animales se cambiaron de caja y se conectó su cánula con una extensión de tubo llena de mezcla para cánula, esta extensión era de más de 30 cm de largo por lo cual de forma remota se podía infundir sustancias.

### *Implantación de cánula ICV*

Se usaron cánulas guía de diámetro externo 0.022” y diámetro interno de 0.0135” de 1 cm de largo. Se colocaron obturadores, mandriles, dentro de la cánula para evitar que se obstruyeran. Solo en el día de la microinyección se usó una aguja dental que medía 1.08cm pretendiendo llegar al ventrículo lateral (VL) y micro-infundir Fructosa 5mg/Kg a 10 $\mu$ L/min. Esta dosis es similar a la administración central de 2-desoxiglucosa (2DG) (**Herrera-Moro 2016**) o fructosa (**Kinote 2010**); con estas dosis se han observado cambios en la regulación de la glucemia.

Para la implantación de la cánula guía en el VL se anestesió a los animales y se colocaron en un aparato estereotáxico. Se inyectó subcutáneamente en la base del cráneo lidocaína para evitar sangrados. Se expuso el cráneo con una incisión que dejara visible la línea media del cráneo, y los puntos de referencia conocidos como Bregma y Lambda (**Paxinos 2013**). Se tomó de referencia a Bregma (**Paxinos 2013**) y se hizo un agujero en el cráneo por arriba de las coordenadas del VL (AP -0.7, ML  $\pm$  1.8, DV -2.8), estas coordenadas están a 0.8 mm del VL, la aguja dental pretende llegar al VL. Se atornillaron dos tornillos de acero inoxidable en la base del cráneo en puntos opuestos quedando el agujero de la cánula guía en el centro. Se colocó la cánula guía de acero inoxidable en la posición del VL y se fijaron con monómero y cemento dental a la base del cráneo. Al final de cada cirugía se aplicó violeta de genciana para evitar infecciones y favorecer la cicatrización. Las ratas permanecieron en su caja durante una semana para su recuperación.

### *Implantación de cánula de microdiálisis en el ARC*

Se usaron cánulas de microdiálisis caseras (**Leon-Mercado 2017**), se establecieron algunos parámetros como el porcentaje de intercambio con respecto a la velocidad de infusión y la difusión de sustancias en el tejido cerebral; para tener la mayor concentración de fructosa en el ARC sin afectar núcleos cercanos.

Se procedió de la misma manera que el protocolo anterior, se colocó una cánula de microdiálisis unilateralmente en el ARC, se utilizó Lamda como línea de referencia (**Paxinos 2013**) y se utilizó una diferencia con respecto a bregma de 8.5mm (coordenadas AP -2.7, ML  $\pm$  1.8, DV -9.65, ángulo de 10°, toothbar -3.3). Se colocaron tres tornillos de acero inoxidable, un tornillo necesario para realizar los experimentos de forma remota y la cánula IV se exteriorizó a la altura de la cabeza, se fijaron con monómero y cemento dental a la base del cráneo. Para la implantación bilateral se procedió de la misma manera salvo que se colocaron cuatro tornillos pequeños.

### *Implantación de Telemetry*

Se implantó intraperitoneal un Telemetry Starr Life Sciences Corp modelo PDT 4000 HR E-Mitter según el manual de usuario. Estos sistemas permiten evaluar frecuencia cardíaca (pulsaciones por minuto (BPM)), temperatura corporal (°C) y actividad locomotora (cuentas por minuto (CPM)) además de ser de un tamaño discreto y no molesto para los animales. Para el análisis de los datos, en el caso de la temperatura se excluyeron valores menores a 33°C ya que esto indicaba que el sensor se encontraba más cercano a la piel, en el caso de la frecuencia cardíaca se excluyeron valores menores a 300 PPM.

### *Diseño experimental*

Todos los experimentos se realizaron en un cuarto oscuro, previo a los experimentos por lo menos 8 horas antes se les apagó la luz y se mantuvieron en oscuridad constante (CT), los experimentos se realizaron en las siguientes 24h horas. Solo el experimento con el ayuno se realizó en condiciones de Luz:Oscuridad.

Se administró fructosa (FRU) IV 500mg/mL/kg disuelta en solución salina estéril en CT2 (n=10) y CT11 (n=8) por medio de una cánula remota y se observó la glucemia a los 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos (Fig. Res 1, 2, 3, 5, 6). Se ayunó a los animales por 24 horas, se administró fructosa en ZT2 y se midió la respuesta de glucemia (Fig. Res 3). Debido a que se han reportado diversos efectos hiperosmóticos de la fructosa se utilizó como control PEG 1450 al 30%/mL/kg en CT2 (n=5) y se midió la glucemia a los 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. También se probó con PEG 400 1g/kg (n=4) y Manitol 500mg/mL/kg (MAN) (n=2) (Fig. Res 2). En otro grupo de animales se les implanto un telemetry para evaluación de frecuencia cardíaca, temperatura corporal y actividad locomotora, después de FRU IV en CT2 (n=5) (Fig. Res 7).

De la misma manera se procedió con la administración ICV de fructosa, previo al experimento se manipularon por una semana a los animales, y el día experimental se tomó una muestra de sangre al tiempo 0 y se manipulo a los animales para micro-infundir fructosa 5mg/Kg a 10 $\mu$ L/min en CT2 (n=4) y CT11 (n=3). Se regresó a los animales a su caja y se muestreo remotamente por la extensión de cánula (Fig. Res 4).

Para la microdiálisis en el ARC (MDA) se infundió fructosa 100mg/mL o 50mg/mL a 3 $\mu$ L/min en solución Tyrode esterilizada en autoclave (NaCl 134mM, KCl 2.68mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.417mM, NaHCO<sub>3</sub> 11.9mM, sin glucosa, pH 7.3; Na<sup>+</sup> 146 mOsm, K<sup>+</sup> 2.68 mOsm, Ca<sup>2+</sup> 1.8 mOsm, Cl<sup>-</sup> 140.28mOsm, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 11.9mOsm) debido a su similitud con el líquido cerebrospinal (Na<sup>+</sup> 147 mOsm, K<sup>+</sup> 2.86 mOsm, Ca<sup>2+</sup> 1.14 mOsm, Cl<sup>-</sup> 113mOsm, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 23.3mOsm, pH 7.3; **Hladky 2014**).

Se muestreo de la misma manera a los 0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos (Fig. Res 5, 6). Previo a la administración de fructosa se administró solución Tyrode como vehículo (VEH) para observar si generaba respuestas de hiperglicemia.

En otro grupo de animales se realizó la administración de salina (VEH, n=4) o FRU (n=7) en CT2, se midió la glucemia a los 0 y 5 minutos, a los 5 minutos se administró Azul de Evans (AE) para la evaluación de la permeabilidad y se sacrificaron a los 10 minutos (Fig. Res 8, 9, 10, 11).

Con ayuda de la Dra. Hurtado-Alvarado, de este último grupo de animales se tomaron secciones del ARC y se realizó una inmunofluorescencia contra GLUT1, para la evaluación de la BHH (**Rodríguez-Cortés 2022**), FRU n=5 o VEH n=5 (Fig. Res 12). Se evaluó la permeabilidad a glucosa con un ensayo de permeabilidad con glucosa fluorescente (2NBDG, (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl) amino]-D-glucose)) con una dosis de 0.83mg/kg (**Rodríguez-Cortés 2022**). Similar al ensayo de permeabilidad, FRU (n=3) o VEH (n=2) en CT2, se midió la glucemia a los 0 y 5 minutos, a los 5 minutos se administró 2NBDG para la evaluación de la permeabilidad y se sacrificaron a los 10 minutos (Fig. Res 13, 14).

### ***Perfusión y ensayo de permeabilidad***

Para la evaluación de la permeabilidad se perfundió a los animales con 200 mL de 4% Paraformaldehído con buffer de fosfatos (PFA, 0.1M pH 7.2). Se extrajo los cerebros y se post fijaron por un máximo 36 horas en PFA 4% y 48 horas en 30% sacarosa para crioproteger.

Para el ensayo de permeabilidad, el día experimental se preparó una mezcla de Azul de Evans (AE; Evans blue Sigma-Aldrich, USA Cat. Number E2129) al 5% en solución salina estéril (0.9%). Se administró IV en un volumen de 1mL/kg (50mg/kg) y 5 minutos después se sacrificó al animal con una sobredosis (0.7mL/Kg) IV de Pentobarbital (Pisabental, PiSA, USA) y se prosiguió a perfundir al animal inmediatamente.

Se obtuvieron secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de EM-ARC con un criostato (Cryostat CM2850, Lupetec) a  $-28^{\circ}\text{C}$  y se colocaron directamente sobre portaobjetos. El mismo día se observaron en un microscopio confocal (Microscopio Confocal Nikon A1R+ STORM) y se tomaron microfotografías. Para todas las secciones se utilizaron los mismos ajustes. Se analizó las imágenes usando el programa FIJI (**Schindelin et al 2012**) y se tomaron las mismas regiones de interés (ROIs) para cada animal de ARC-EM. Se utilizó la media y la moda de la distribución de los valores de gris como representante de la permeabilidad de la EM. Para evaluar la penetración hacia el ARC se utilizó una línea de 50 $\mu\text{m}$  de ancho por 450 $\mu\text{m}$  de largo con un ángulo de  $45^{\circ}$  desde el infundíbulo ventricular, la interfaz entre el ARC y EM (**Rodríguez-Cortés 2022**), y se obtuvo un “plot profile” de esta región, por cada animal se evaluó de 4 a 7 microfotografías de la región medial del ARC-EM, descartando la región rostral y caudal.

### ***Inmunofluorescencia contra GLUT1***

Se obtuvieron secciones coronales con un criostato (descrito anteriormente) del ARC. Se mantuvieron en 0.1 PBS en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta el día en que se realizó la inmunofluorescencia. Se tomaron las secciones y se lavaron con 0.1 PBS y se prosiguió a bloquear en solución de bloqueo (0.1% fracción V de albumina bovina, 0.2% triton X-100 en 0.1 M PBS) por 30 minutos o hasta que las secciones no soltaran debris a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se incubaron en una solución con el anticuerpo primario mouse anti-GLUT1 (1:1000 Thermo Fisher Scientific Cat PA5-16793; RRID: AB\_10986893) y mouse anti-Vimentina (1:2000 GeneTex Cat GTX629744; RRID: AB\_2814972) diluido en solución de bloqueo en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Al día siguiente, se lavaron las muestras y se incubó con el anticuerpo secundario por 2 horas a TA. Se lavaron y se montaron las secciones en portaobjetos gelatinizados, se cubrieron con Vectashield mounting médium (Vector

Laboratories, USA Cat. H-1700). Se obtuvieron imágenes en el microscopio confocal Nikon A1R+ STORM con CFI Plan Fluor 20X N.A. 0.3. Se realizaron los análisis el programa FIJI (**Schindelin et al 2012**).

### ***Análisis estadístico***

En todas las figuras de resultados se señala los análisis estadísticos que se realizaron. Los valores se muestran como promedio  $\pm$  SEM. Todos los análisis fueron realizados en Prism 9 Software, GraphPad.

## RESULTADOS

### *Efectos de la administración IV de fructosa sobre la glucemia en dos distintos momentos del día, inicio de la fase de reposo (CT2) y previo a la fase de actividad (CT11).*

El transporte de sustancias desde la circulación al ARC presenta un ritmo circadiano, es más eficiente en el inicio de la fase de reposo (CT2) que en el inicio de la fase de actividad (CT11). Como se ha mencionado el ARC es central en la regulación de la glucemia y podría recibir información más eficientemente de agentes hipoglucemiantes en un momento del día que en otro. Aquí evaluamos si FRU IV inducía un aumento en la glucemia solo cuando el ARC era más permeable (CT2). Encontramos que FRU IV solo en CT2 inducía hiperglucemia en los primeros 5 y 10 minutos con respecto a lo observado en CT11 (Fig. 1 A, B, C).

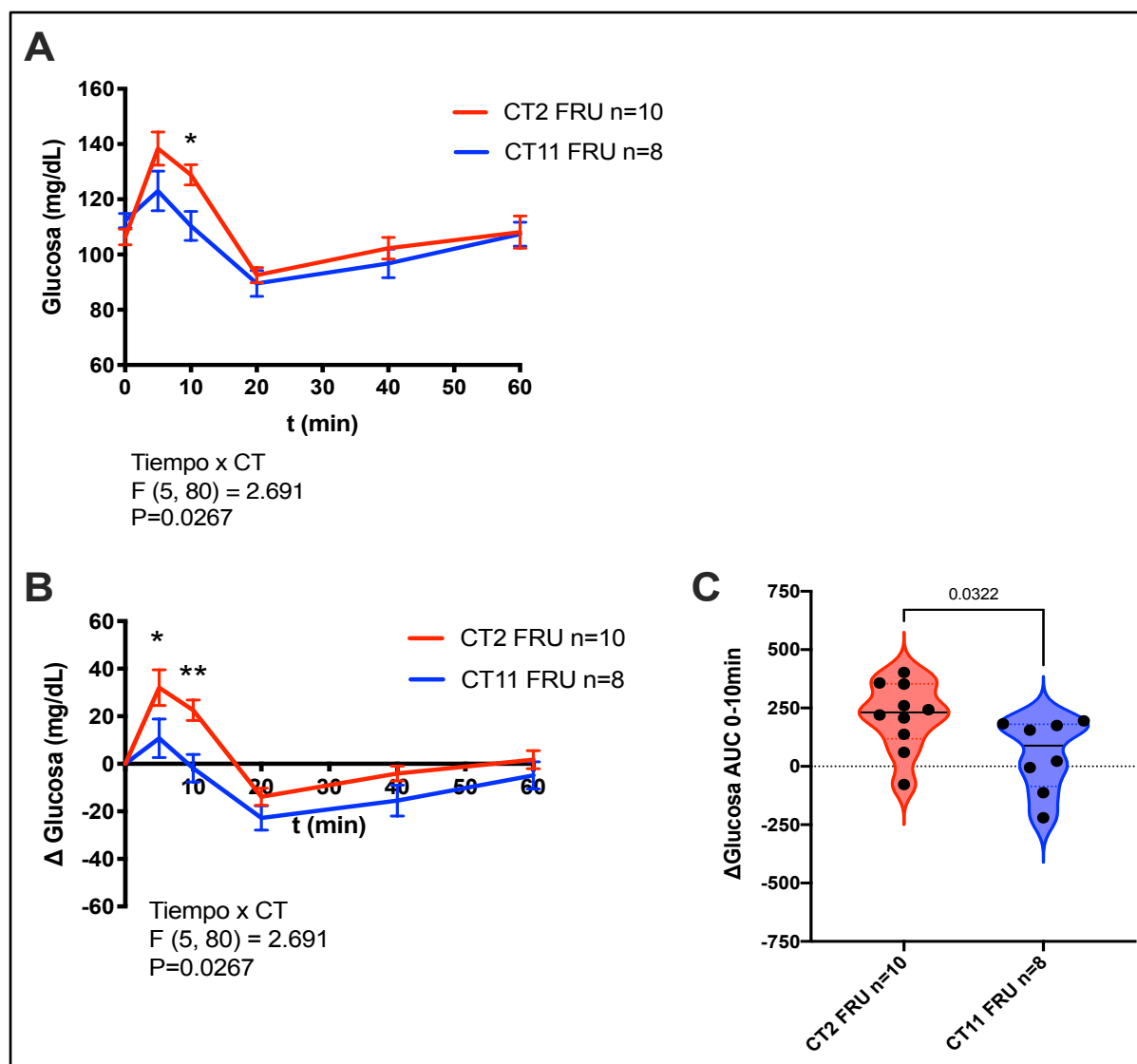


Figura 1 Resultados. Solo cuando el transporte al HMB es mayor (CT2) la administración de fructosa a nivel sistémico induce una respuesta de hiperglicemia aguda.

A) valores de glucemia (0, 5, 10, 20, 40, 60 minutos) después de FRU IV en CT2 y CT11. B) se muestran la diferencia con respecto al tiempo 0 de los valores de glucemia; A) y B) se muestra el valor de F y de P de la interacción del tiempo x CT de una ANOVA de medidas repetidas, análisis post hoc con Bonferroni (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.005$ . C) valor del Área Bajo la Curva (AUC) de los primeros 10 minutos post FRU, se muestra el valor de P de una prueba t.

## La respuesta ante fructosa depende del estado energético del animal

Igualmente se ha sugerido que la fructosa induce hiperglucemia ya que es metabolizada a glucosa debido a la vía del sorbitol (Cha 2008), sin embargo, quisimos evaluar si la hiperglicemia se debe a la activación de la gluconeogénesis hepática. Evaluamos si en condiciones donde las reservas de glucosa del hígado son bajas (y no puede liberar tanta glucosa por glucogenolisis) aun existía hiperglucemia por fructosa. Como se observa en Fig. 2A la respuesta ante FRU IV después de 24 horas de ayuno es menor a los 5 minutos, lo cual sugiere que esta respuesta depende de la producción o liberación de glucosa hepática y no a la conversión de fructosa a glucosa por la vía del sorbitol.

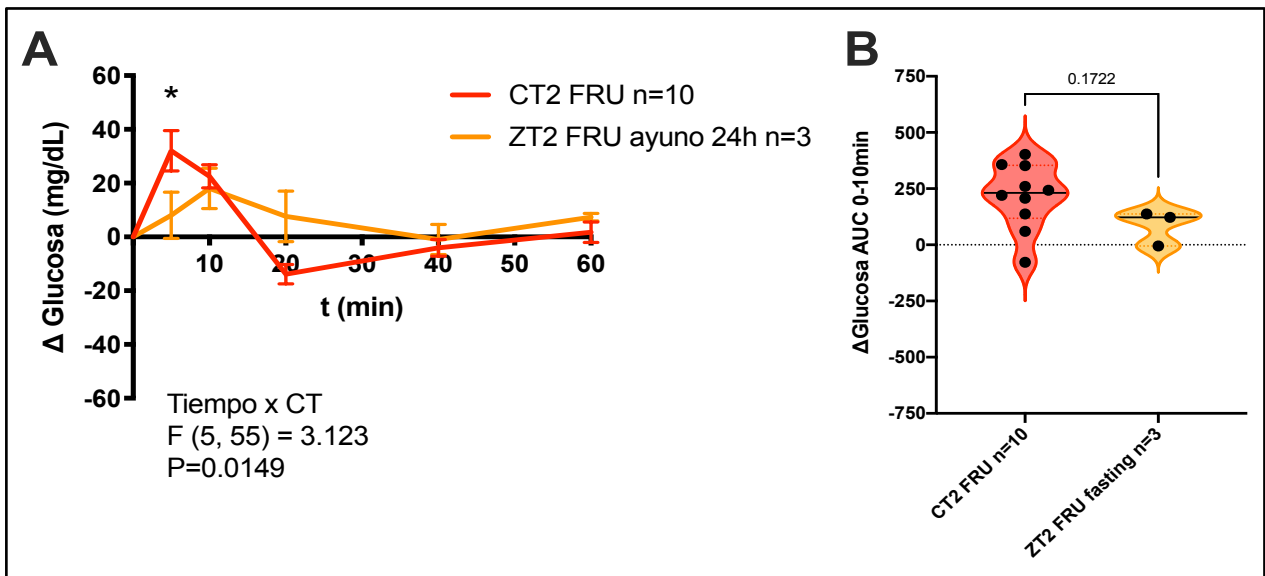


Figura 2 Resultados. **El ayuno reduce la hiperglucemia post FRU IV en ZT2.**

A) animales ayunados 24h recibieron FRU IV en ZT2, se muestran la diferencia con respecto al tiempo 0 de los valores de glucemia, se comparó con FRU IV en CT2 sin ayuno; se muestra el valor de F y de P de la interacción del tiempo x CT de una ANOVA de medidas repetidas, se realizó un análisis post hoc con Bonferroni en la gráfica se observa (\*)  $p < 0.05$ .

B) valor de AUC de los primeros 10 minutos post FRU, se muestra el valor de P de una prueba t.



**La respuesta de hiperglucemia no depende de la alta osmolaridad o presión osmótica.**

Debido a que la fructosa presenta efectos hiperosmóticos similares a la deshidratación, como la liberación de AVP (Wolf 1992), y la dosis de fructosa que se utiliza tiene una alta osmolaridad (2.7 OsmM), quisimos asegurar que el efecto sobre la glucemia se debía a la naturaleza de la fructosa. Se probó distintas soluciones que generan respuestas hiperosmóticas PEG 1450 (0.2 OsmM) o con una alta osmolaridad PEG 400 (2.5 OsmM) (Fig. 2A, B), además se probó manitol (2.7 OsmM) debido a su similitud con los monosacáridos (Fig. 2C). Ningún tratamiento indujo una respuesta de hiperglucemia aguda a los 5 o 10 minutos como lo observado con FRU IV (Fig. 2D), por lo que esta respuesta no depende de los efectos osmóticos de la fructosa p. ej. liberación de AVP.

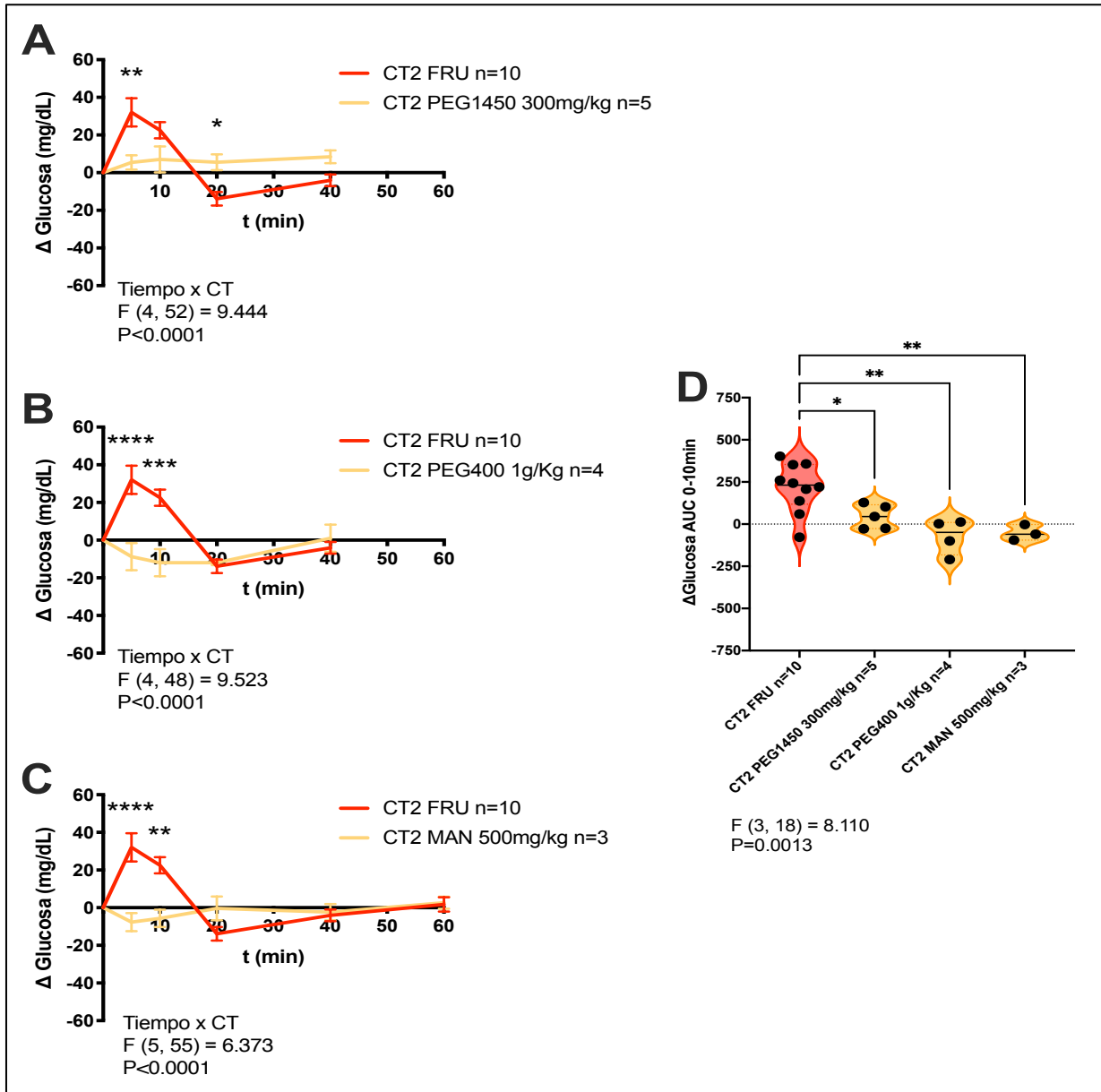


Figura 3 Resultados. **El efecto hipoglucémico de la fructosa no se debe a la alta osmolaridad, ni a la presión osmótica, ni a la liberación de AVP.**

A), B) y C) se muestran la diferencia con respecto al tiempo 0 de los valores de glucemia previo a la administración IV de A) PEG1450 en una dosis de 300mg/Kg, B) PEG400 en una dosis de 1g/Kg o C) MAN en una dosis de 500mg/Kg en CT2, se comparó con la administración de FRU en CT2; A), B) y C) muestran el valor de F y de P de una ANOVA de medidas repetidas debajo de la gráfica, se realizó un análisis post hoc con Bonferroni en la gráfica se observa (\*) p<0.05, (\*\*) p<0.005, (\*\*\*) p<0.0005, (\*\*\*\*) p<0.0001.

D) valor AUC de los primeros 10 minutos post tratamiento, se muestra el valor de F y P de una ANOVA de una vía, se realizó un análisis post hoc con Bonferroni en la gráfica se observan el valor es P.

## La administración de fructosa no induce respuestas agudas autonómicas (cambio en frecuencia cardíaca o temperatura corporal)

Agentes hipoglucemiantes como 2-desoxiglucosa (2DG) generan hiperglucemia debido a liberación de adrenalina (Yamamoto 1983), y al igual que la respuesta ante fructosa, esta respuesta presenta diferencias luz:oscuridad, teniendo la mayor hiperglucemia durante la fase de reposo (Yamamoto 1983). En el caso de la fructosa, en algunos reportes se ha observado que su administración induce liberación de adrenalina (Gabriely 2002) y otros donde no se observa (Weil-Malherbe 1954), aquí se exploró la posibilidad de que la fructosa indujera liberación de adrenalina. Como primera aproximación se exploró si modificaba la temperatura corporal, frecuencia cardíaca o actividad locomotora, siendo estas al igual que la glucemia modificada por la adrenalina. Sin embargo, FRU IV no modificó ninguna de estas variables de forma aguda (Fig. 4B, D, F).

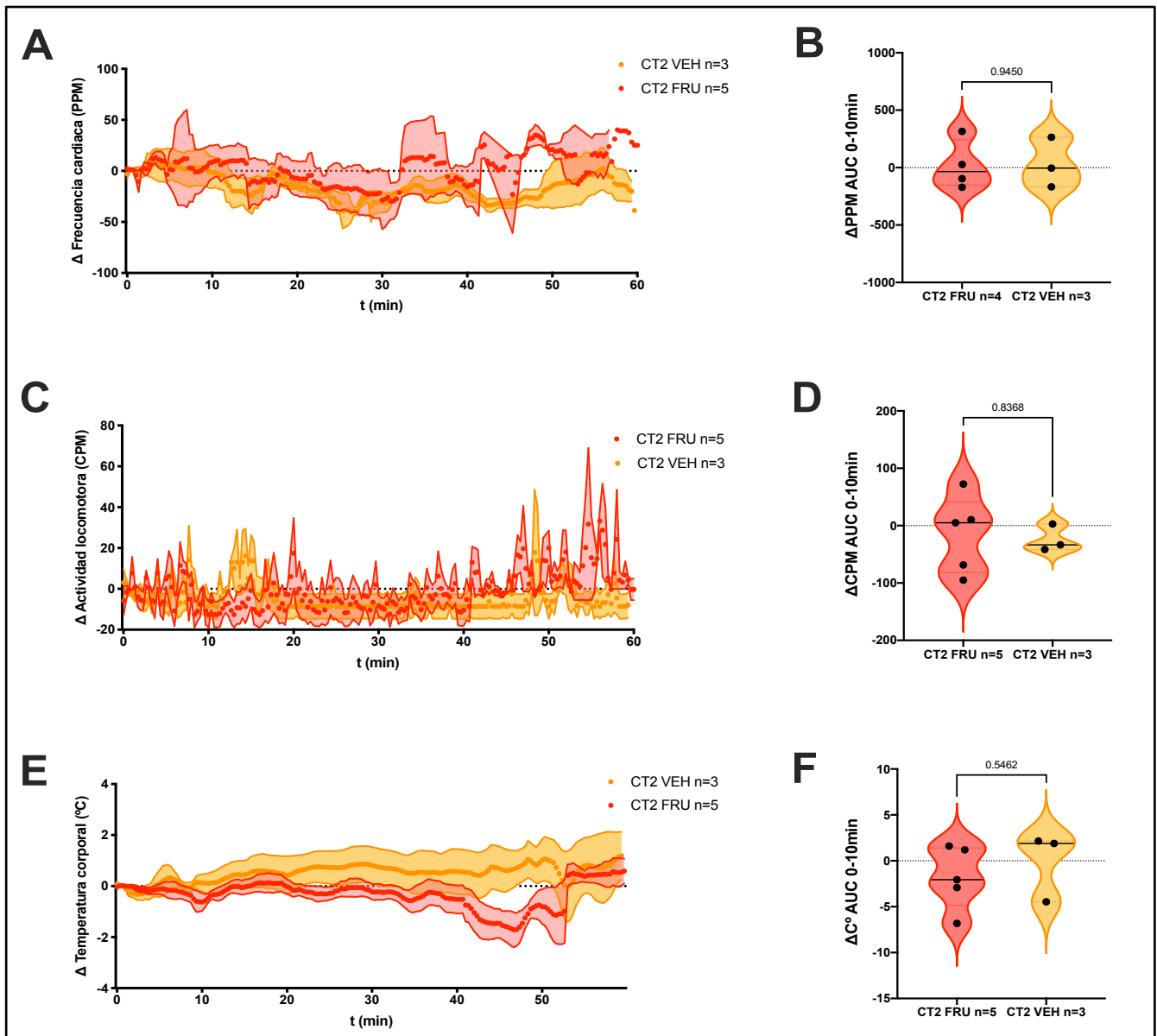


Figura 4 Resultados.

**La administración de fructosa en CT2 no induce una respuesta generalizada de activación del sistema nervioso simpático**

A), C) y E) diferencia con respecto al tiempo 0 de FRU o solución salina (VEH) de A)  $\Delta$  BPM, C)  $\Delta$  CPM, D)  $\Delta$  C°. No se realizó estadística debido a que existen valores faltantes o excluidos.

B), D) y F) valor del AUC de los primeros 10 minutos post FRU, de A)  $\Delta$  BPM, C)  $\Delta$  CPM, D)  $\Delta$  C° se muestra el valor de P de una prueba t.

## La administración directa de fructosa en el SNC o en el ARC recapitula la hiperglicemia inducida por la administración IV

Existen reportes que sugieren que la administración central de fructosa puede inducir efectos metabólicos, particularmente sobre la regulación de la glucemia (Cha 2008; Faria 2017; Kinote 2012). Para demostrar que los efectos observados se deben a una fracción de fructosa que llegan al SNC, debido a la permeabilidad elevada del ARC en CT2, se administró FRU ICV en CT2 y CT11. Se observó que solo la administración en CT2 genera hiperglicemia (Fig. 5A) que dura hasta los 60 minutos post FRU. Esta respuesta también es aguda como la administración IV ya que en los primeros 10 minutos tiende a ser mayor que CT11 (Fig. 5B) y es significativamente mayor a los 20 minutos (Fig. 5C).

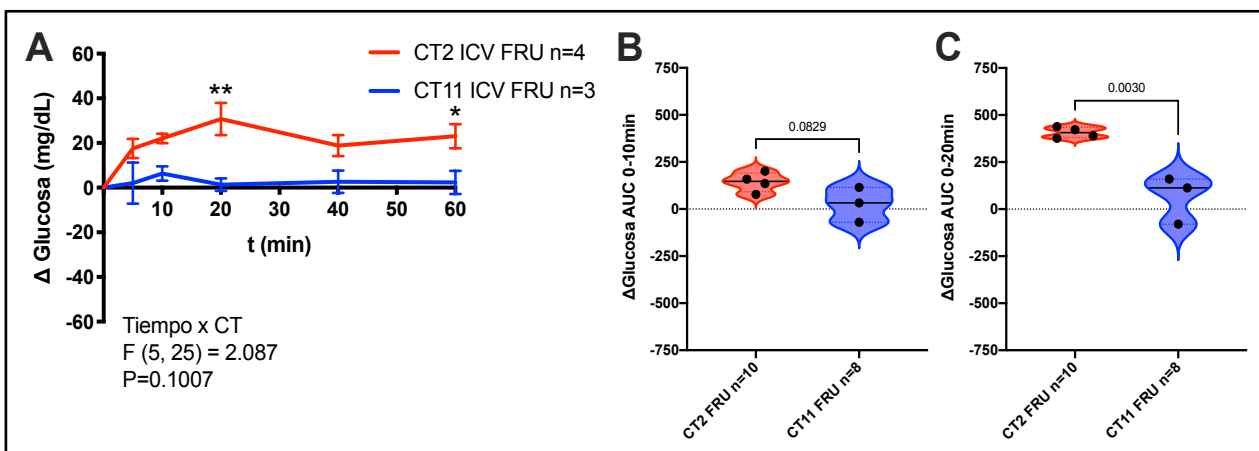


Figura 5 Resultados. **Solo cuando el transporte al HMB es mayor (CT2) la administración de fructosa centralmente induce una respuesta de hiperglicemia aguda**

A) se muestran la diferencia con respecto al tiempo 0 de los valores de glucemia, previo a FRU ICV en CT2 y CT11; se muestra el valor de F y de P de la interacción del tiempo x CT de una ANOVA de medidas repetidas, se realizó un análisis post hoc con Bonferroni en la gráfica se observa (\*\*)  $p < 0.005$ .

B) y C) valor de AUC de los primeros B) 10 minutos o C) 20 minutos post FRU ICV, se muestra el valor de P de una prueba t.

Igualmente, en estos reportes (Cha 2008; Kinote 2012) se sugería la participación del ARC, por lo que se procedió a evaluar si la administración directa de fructosa en la región del HMB, incluido el ARC, podría ser el responsable de la hiperglucemia. Se implantó cánulas de microdiálisis que pretendían llegar al ARC (MDA). Se observó que FRU en el 3V (Fig. 6A) logra aumentar la glucemia rápidamente a niveles similares a la administración IV. Sin embargo, la administración unilateral en la región del ARC-VMH no puede llegar a esta respuesta rápidamente y sostenida (Fig. 6 B, C).

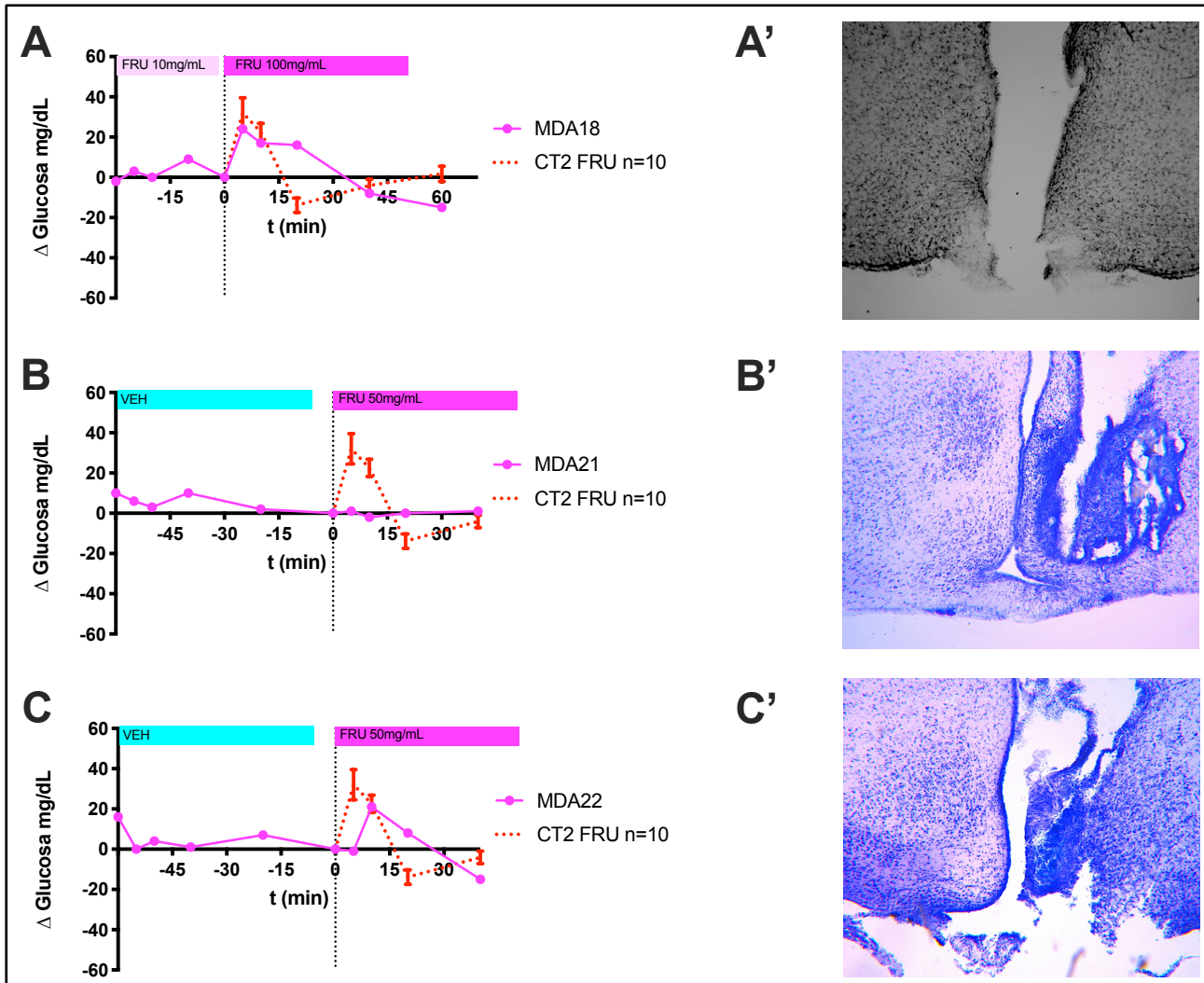
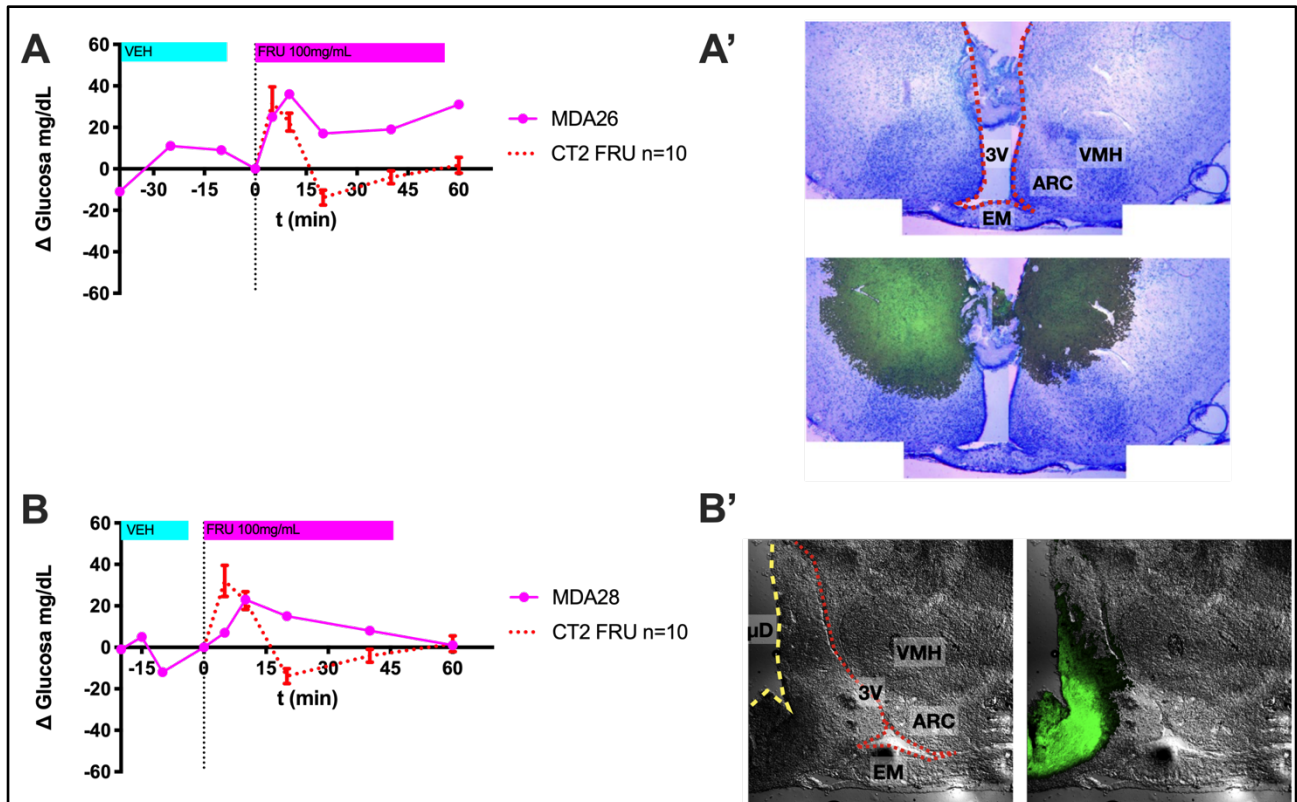


Figura 6 Resultados. **La sola administración de fructosa en CT2 en el 3V induce hiperglucemia.** A), B) y C) representan un solo animal y se muestran la diferencia con respecto al tiempo 0 de los valores de glucemia, previo FRU por MDA (se administró fructosa en: A) 100mg/mL, mientras que en B) y C) fueron 50mg/mL); previo a la administración de FRU se administró A) FRU 10mg/mL o B), C) solución Tyrode que es el vehículo (VEH). También se muestra el grupo de FRU IV en CT2 en comparación. A'), B') y C') muestra micrografías representativas de la región del HMB donde se observa el tracto de la cánula de  $\mu$ D, en A') se realizó una IHQ contra GFAP, en B') y C') una tinción con azul de toluidina.

En la Fig. 7 se muestran los resultados de la administración bilateral de FRU en la región del HMB. Se observa que FRU MDA genera una respuesta de hiperglucemia sostenida y aguda similar a la observada con la administración IV (Fig. 7 A, B). Se utilizó FITC para observar la difusión de sustancias por la cánula de microdiálisis (Fig. 7 A', B'). Esto sugiere que la región HMB es capaz de generar hiperglucemia debido a la detección de fructosa.



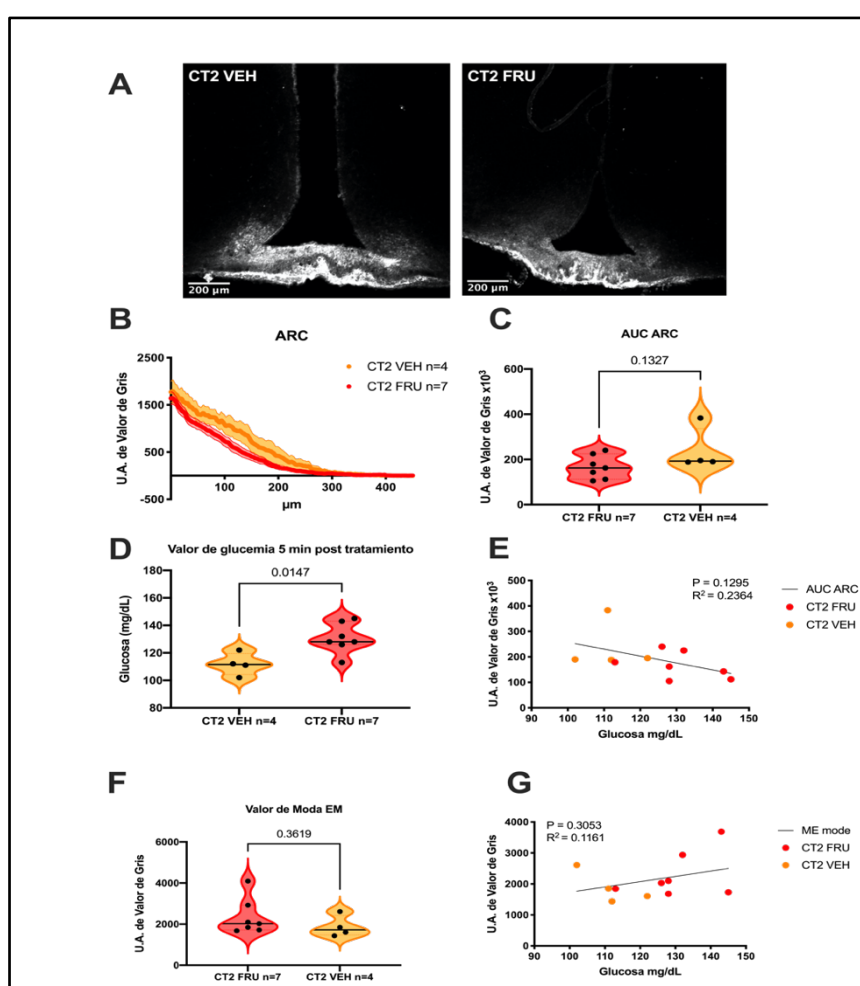
**Figura 7 Resultados. La administración bilateral de fructosa en CT2 en el HMB induce hiperglucemia**

A) y B) representan un solo animal y se muestran la diferencia con respecto al tiempo 0 de los valores de glucemia cuando se administró FRU 100mg/mL; previo a la administración de FRU se administró VEH. También se muestra el grupo de FRU IV en CT2 en comparación.

A') y B') se muestran micrografías representativas de la región del HMB, en A' y B' previo al sacrificio del animal se administró una solución con FITC 1mg/mL por 10min por la cánula de  $\mu$ D. La marca de FITC se observa en color verde como imagen sobrepuesta en A' y en B'. En A') en esas mismas secciones se realizó una tinción con azul de toluidina, en B) se observa la imagen del ARC en campo claro. En ambas imágenes se muestra las regiones del ARC, EM, VMH, en línea punteada roja el 3V, en B') se observa el tracto de la cánula de  $\mu$ D con línea punteada amarilla.

**La administración de fructosa modifica la BHH de forma aguda; disminuye la penetración de sustancias al ARC y al 3V, disminuye la inmunoreactividad de GLUT1 en los tanicitos, y tiende a disminuir el transporte específico de glucosa al HMB.**

La permeabilidad circadiana de la BHH y el ritmo de glucemia mantienen una relación inversamente proporcional, la disminución en la entrada de glucosa al ARC induce un incremento en la glucemia (Rodríguez-Cortés 2022; Langlet 2013b). Además, la BHH se regula y es plástica, capaz de modificarse a lo largo del día o de forma muy aguda al inhibir la señalización de AVP (Rodríguez-Cortés 2022); por lo cual quisimos evaluar si el efecto de la hiperglicemia inducida por fructosa se debía a un decremento agudo de la permeabilidad de la BHH (Rodríguez-Cortés 2022). Evaluando el valor de gris de la entrada de AE hacia el ARC no se observa una disminución de la penetración (Fig. 8 B, C). El valor de AUC del ARC no correlaciona con los cambios observados en la glucemia (Fig. 8 D, E). Los valores de la EM tampoco explican los cambios en la glucemia (Fig. 8 D, F, G).



**Figura 8 Resultados. Efecto agudo de la fructosa sobre la permeabilidad del ARC en CT2.**

Se administró FRU IV y a los 5 minutos se realizó el ensayo de permeabilidad con AE (50mg/kg).

A) muestra micrografías representativas de la permeabilidad del ARC después de 5 min de FRU o VEH en CT2.

B) muestra el valor de gris de la penetración de AE hacia el interior del ARC desde la región infundibular del ventrículo.

C) AUC en el ARC, D) valor de glucemia a los 5 minutos post FRU o VEH, F) valor de moda de la distribución de grises de la región EM, se muestra el valor de P de una prueba de t VEH contra FRU.

E) y G) correlación lineal del valor de glucemia a los 5 min post FRU o VEH con D) el valor de AUC en el ARC o F) el valor de moda de la EM, se muestra el coeficiente de correlación y el valor de P.

Se realizó un análisis con el cociente entre el valor de gris del ARC y el valor moda EM, ya que esta medida representa la cantidad de sustancia que entra desde la EM hacia el ARC. Este cociente (ARC/moda EM) nos habla de la eficiencia de transporte hacia el ARC, mientras más cercano a 1 indica que la penetración del AE al ARC es muy similar a la EM. Se observa una menor penetración de AE al ARC debido a FRU (Fig. 9 A, B) esta penetración es similar a CT11. El valor normalizado del AUC del ARC presenta una tendencia a una correlación significativa con respecto al valor de glucemia observado en los primeros 5 min post tratamiento (Fig. 9 C). Esto señala que FRU induce un decremento en el transporte de sustancias al ARC, por lo que igualmente se evaluó la permeabilidad de AE al 3V (Fig. 10).

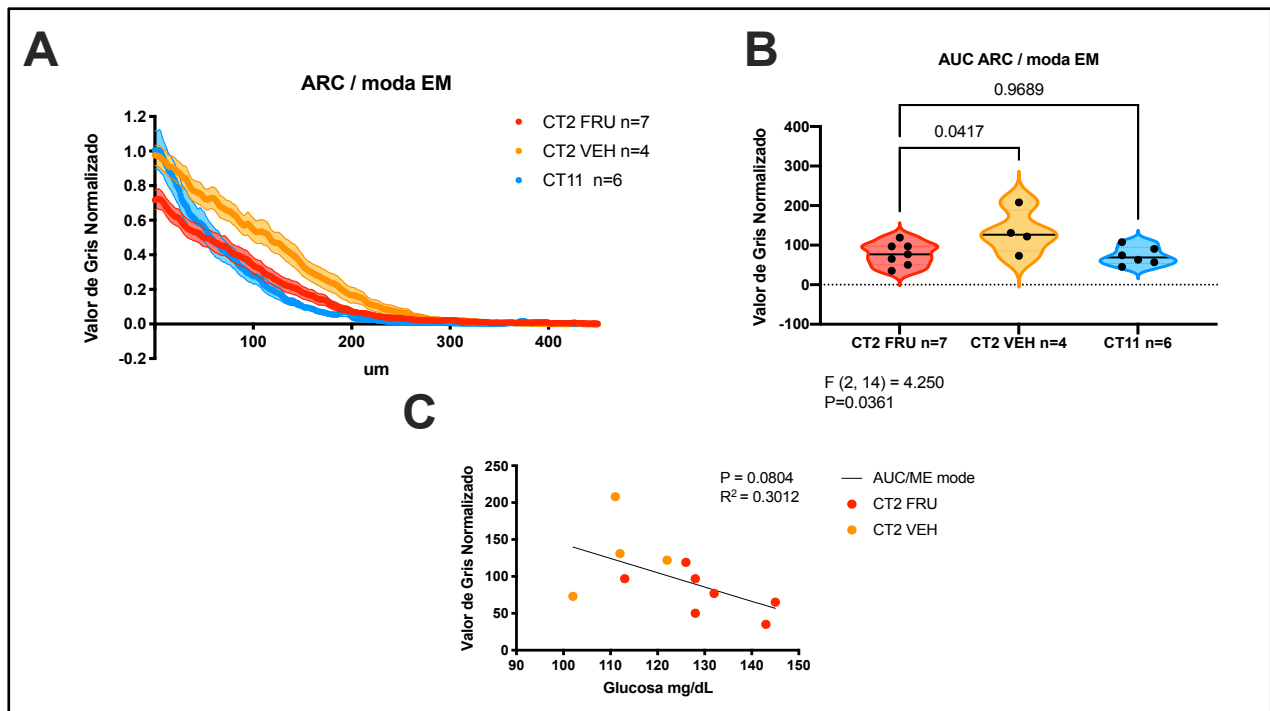


Figura 9 Resultados. **La fructosa en CT2 disminuye agudamente la permeabilidad del ARC a niveles de CT11.** A) se normalizaron los datos de (Fig. 8B) con respecto a su valor de moda EM, además se muestra el valor normalizado en CT11. B) AUC del valor normalizado de la penetración de AE al ARC en CT2 FRU y VEH, además del valor en CT11, debajo de la gráfica se muestra el valor de F y P de una ANOVA de una vía, además se muestran los valores de P del análisis post hoc con Bonferroni. C) correlación lineal del valor de AUC ARC normalizado con el valor de glucemia a los 5 min post FRU o VEH, se muestra el coeficiente de correlación y el valor de P.

Como se muestra en la Fig. 10 A el AE permea al interior del 3V apareciendo en el borde ventricular del VMH. Evaluamos la región del borde del ventrículo, desde la región infundibular hasta 1000  $\mu\text{m}$  arriba de este punto (Fig. 10 A). En los valores de gris, no se observan diferencias en el transporte hacia el 3V (Fig. 10 B, C). Sin embargo, esta marca también tiende a correlacionar con los valores de glucemia 5 min post tratamiento (Fig. 10 D). Cuando se normalizan los datos con respecto a la moda de EM, se observa una disminución significativa de la permeabilidad hacia el 3V con FRU IV CT2, los cuales se asemejan a los valores observados en CT11 (Fig. 11A, B). Este valor presenta una correlación negativa con el valor de glucemia (Fig. 11 C), cuando se administra FRU el transporte hacia el 3V disminuye, similar a CT11 (Fig. 11B), y se induce hiperglucemia.

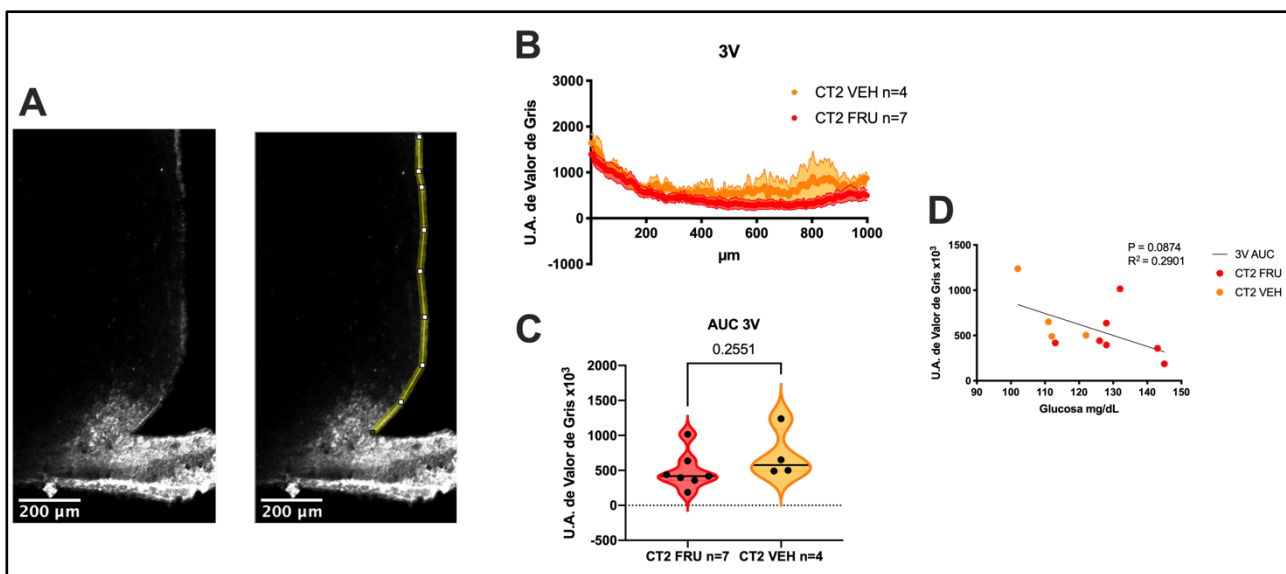


Figura 10 Resultados. **Efecto agudo de la fructosa sobre la permeabilidad del 3V en CT2.**

A) micrografía representativa de la región del 3V de un animal con VEH IV CT2, se muestra del lado derecho la línea que se tomó para los valores de grises en B aproximadamente 1000 $\mu\text{m}$  desde el inicio de la región infundibular hasta la región del VMH.

B) valores de gris del 3V después de realizar el ensayo de permeabilidad 5 post FRU IV o VEH IV. C) AUC de los valores de gris del 3V, se muestra el valor de P de una prueba t VEH contra FRU.

D) Correlación lineal del valor de AUC 3V con el valor de glucemia a los 5 min post FRU o VEH, se muestra el coeficiente de correlación y el valor de P.



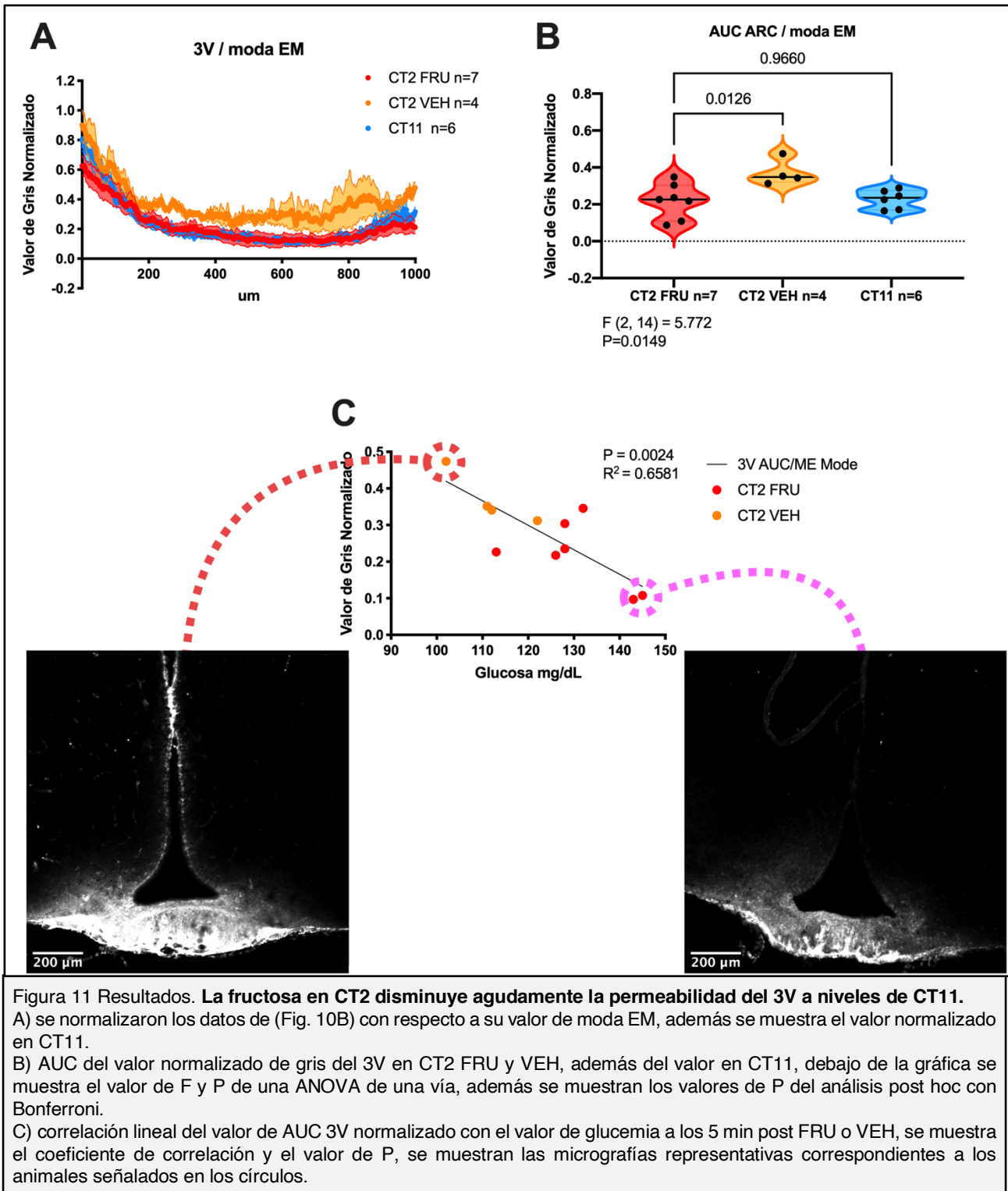


Figura 11 Resultados. **La fructosa en CT2 disminuye agudamente la permeabilidad del 3V a niveles de CT11.**

A) se normalizaron los datos de (Fig. 10B) con respecto a su valor de moda EM, además se muestra el valor normalizado en CT11.

B) AUC del valor normalizado de gris del 3V en CT2 FRU y VEH, además del valor en CT11, debajo de la gráfica se muestra el valor de F y P de una ANOVA de una vía, además se muestran los valores de P del análisis post hoc con Bonferroni.

C) correlación lineal del valor de AUC 3V normalizado con el valor de glucemia a los 5 min post FRU o VEH, se muestra el coeficiente de correlación y el valor de P, se muestran las micrografías representativas correspondientes a los animales señalados en los círculos.

Además, se evaluó si la fructosa podía modificar el transporte específico de glucosa a través de su transportador GLUT1. Este transportador es esencial para la regulación fisiológica de la glucosa por el ARC (Rodríguez-Cortés 2022). Se evaluó la inmunoreactividad de la señal de GLUT1 en tanicitos de las diferentes regiones del ventrículo 10 minutos después de la administración de fructosa (Fig. 12). Se observó que los tanicitos en la región del ARC (Fig. 12 C) presentaron una disminución en la señal de GLUT1, y también los tanicitos ventriculares presentaban una tendencia a una menor señal (Fig. 12 B). Esto indica una disminución en la capacidad de transportar glucosa, por lo que se evaluó si la penetración de glucosa era menor utilizando un análogo fluorescente de glucosa (2NBDG).

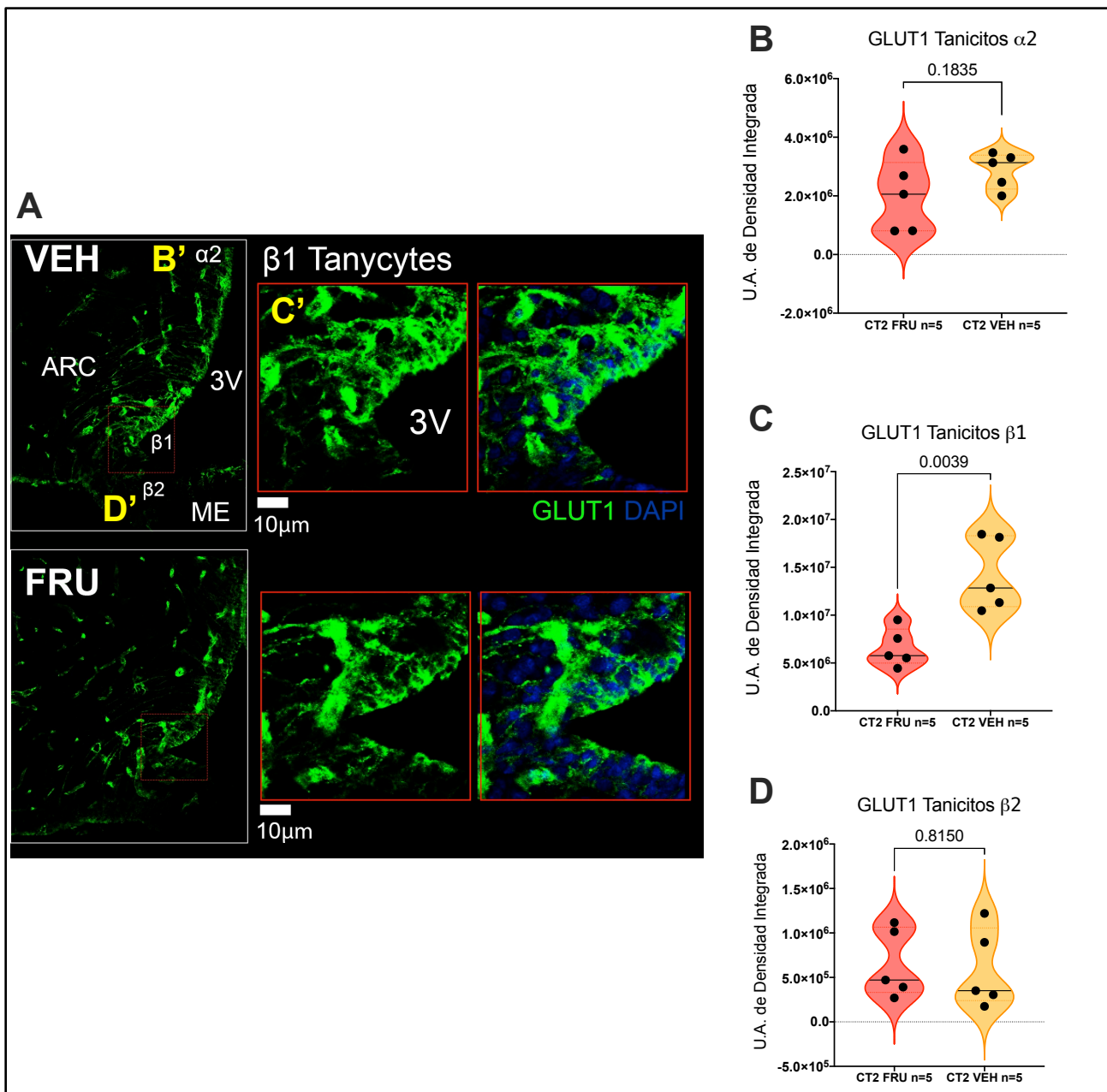
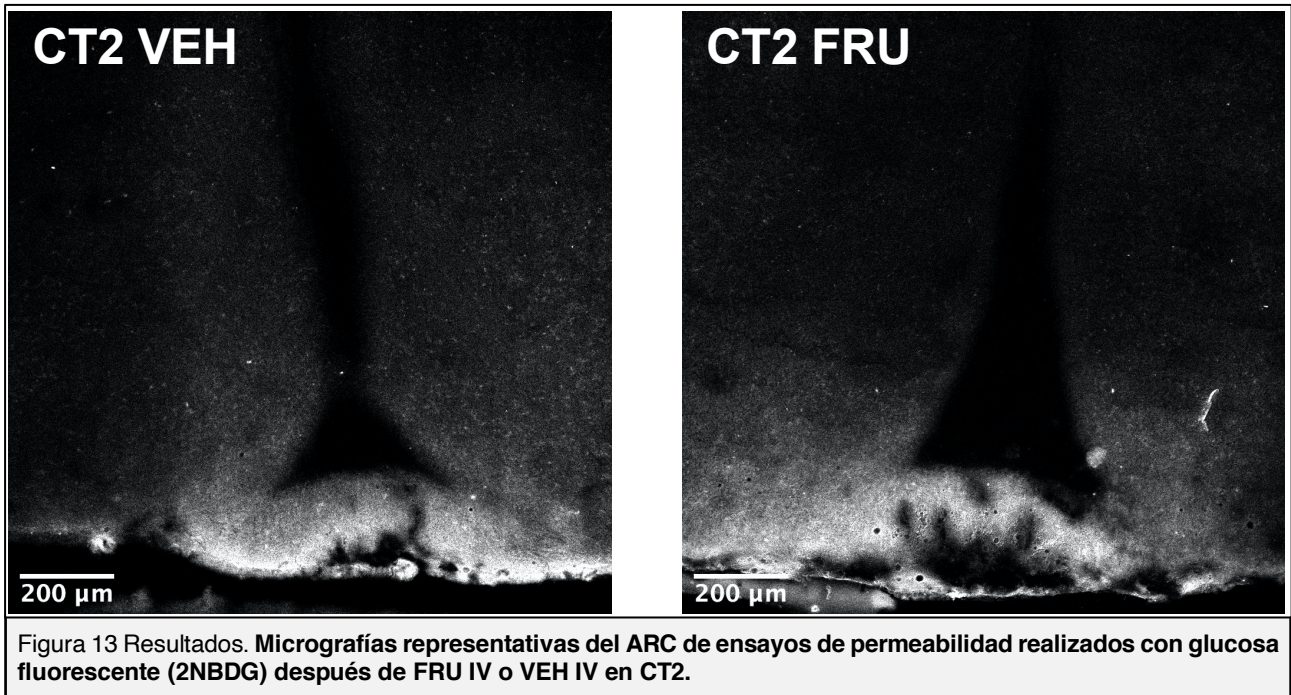


Figura 12 Resultados. La fructosa en CT2 disminuye agudamente la inmunoreactividad de GLUT1 en tanicitos del ARC y 3V.

A) se muestra una micrografía representativa de IHQ contra GLUT1 del ARC, en la parte superior se muestra la inmunoreactividad de GLUT1 después de VEH o en la parte inferior después de FRU; se señalan las regiones de interés: B') región de tanicitos α2, C') región de tanicitos β1 y D') región de tanicitos β2.

B), C) y D) densidad integrada de la inmunoreactividad contra GLUT1 después de la administración de FRU o VEH en las regiones de tanicitos señaladas en B'), C') y D') respectivamente; se muestra el valor de P de una prueba de t.

2NBDG permea al interior del ARC y al 3V (Fig. 13). Sin embargo, la administración aguda de fructosa no disminuyó la entrada de 2NBDG al ARC (Fig. 14 A) aun cuando se normalizan los datos con respecto a la EM (Fig. 14 B). En el caso del 3V se observa una tendencia a un menor transporte de glucosa (Fig. 14 C, D), pero debido a la cantidad reducida de animales no se observa significancia estadística.



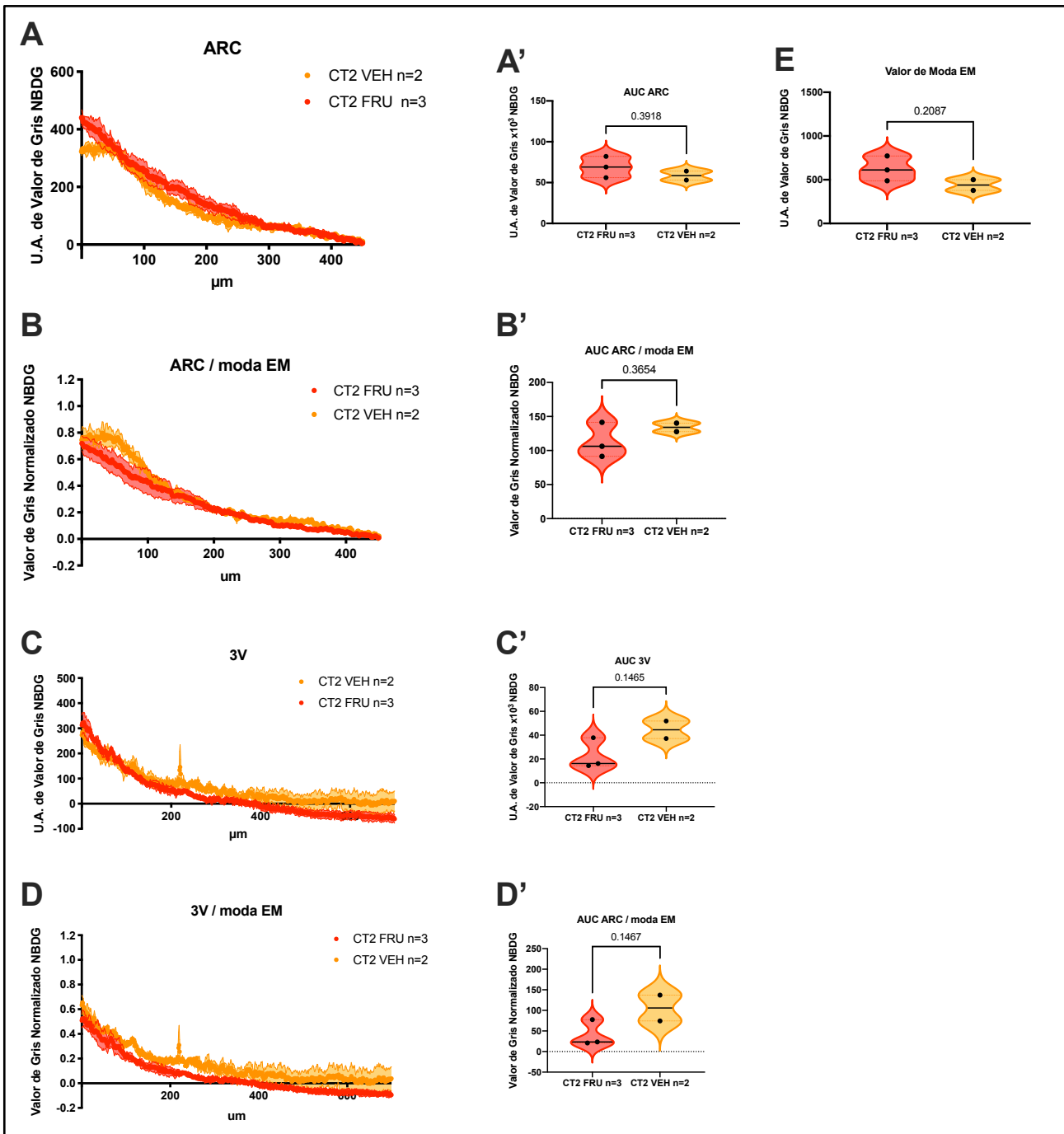


Figura 14 Resultados. **La fructosa en CT2 podría disminuir agudamente el transporte de glucosa al 3V.**

Permeabilidad a glucosa del ARC y 3V después de la administración de FRU IV o VEH IV en CT2.

A) y C) valores de gris de 2NBDG en el A) ARC o en el C) 3V después de realizar el ensayo de permeabilidad 5 minutos después de la administración de FRU o VEH.

B) y D) valor normalizado del A) ARC y C) 3V, respectivamente, utilizando E) la moda de EM.

A'), B'), C') y D') AUC de los valores de gris de A), B), C) y D), respectivamente; se muestra el valor de P de una prueba t VEH contra FRU.

E) valor de la moda de 2NBDG de la distribución de grises en la región de la EM

## DISCUSIÓN

En este trabajo señalamos que la administración de fructosa IV induce hiperglucemia aguda y transitoria (Fig. Res. 1), encontramos evidencia que esto se debe probablemente a una acción de la fructosa sobre la BHH y la entrada de glucosa al HMB (Fig. Res 11, 12, 14). En experimento previos se demostró que la inhibición del transporte de glucosa al ARC induce hiperglicemia transitoria señalando que la entrada de glucosa al ARC es central para mantener los niveles de glucemia bajos (**Rodríguez-Cortés 2022**). Aquí encontramos que la administración de fructosa induce una disminución aguda en la permeabilidad de la BHH (Fig. Res. 9, 11), disminución en la inmunoreactividad de GLUT1 en tanicitos del ARC (Fig. Res. 12) y una tendencia a un menor transporte de glucosa al 3V (Fig. Res. 14). Anteriormente, se había observado que una semana con dieta alta en sacarosa y grasas saturadas no inducía cambios ni en la permeabilidad ni en la expresión de proteínas de unión en la BHH (**Rijnsburger 2018**), sin embargo aquí evaluaron la permeabilidad después de una hora de la administración de AE, en contraste nosotros hemos observado que la BHH tiene la capacidad de responder rápidamente (menos de diez minutos) y modificar el transporte de glucosa lo cual es suficiente para explicar cambios en la glucemia (**Rodríguez-Cortés 2022**). Igualmente, los efectos de la administración IV de fructosa indican que la fructosa actúa agudamente y sugerimos también que sus efectos son reversibles debido a que la hiperglicemia por fructosa es transitoria y la glucemia guarda una relación inversa con la penetración de glucosa al ARC (**Rodríguez-Cortés 2022**). Esto sugiere que mientras los niveles de fructosa en la circulación sean altos la hiperglucemia se mantendrá, lo cual se puede observar con la administración central o por microdiálisis directa en el HMB (Fig. Res. 5, 7), aquí la hiperglucemia se puede mantener desde los 20 hasta incluso los 60 minutos, pero en circulación la fructosa es metabolizada rápidamente por el hígado por lo que su hiperglucemia dura 10 minutos (Fig. Res. 1).

Importantemente, la hiperglucemia inducida por fructosa solo se observa en CT2 y no en CT11 (Fig. Res. 1, 5), esto se podría deber o al ritmo circadiano de permeabilidad de la BHH o a la expresión de circadiana de GLUT1 ambos regulados por la liberación rítmica de AVP por el NSQ hacia los tanicitos del 3V (**Rodríguez-Cortés 2022**, Fig. Res. 9). Debido a que CT2 es la fase cuando el NSQ libera AVP hacia la BHH lo cual aumenta la permeabilidad del ARC (**Rodríguez-Cortés 2022**), sugerimos que se requieren de ambos mecanismos, tanto que la fructosa sea transportada mayormente en CT2 al HMB y una vez que es transportada al HMB disminuya el transporte incrementado de glucosa en tanicitos del 3V (Fig. Res. 11, 12, 14).

Por otro lado, debido a que la administración de fructosa induce liberación sistémica de AVP (**Wolf 1992**), decidimos investigar si esto podría ser un posible mecanismo para los efectos sobre la glucemia, asumiendo que mediante esta vía AVP pudiera actuar sobre tanicitos. No encontramos que la administración de PEG o MAN modificara la glucemia (Fig. Res. 3), sustancias capaces de activar osmosesores centrales (PVN/SON) e inducir liberación de AVP (**McKinley 2008; Zimmerman 2016**). Igualmente en un trabajo previo, encontramos que la permeabilidad de otros CVO, como el SFO o el OVLT, incrementaba debido a una deshidratación por sal, (similar a **Morita 2014**), sin embargo la permeabilidad hacia el ARC no se modificaba (**Martínez Gómez 2019**), por lo cual sugerimos que la liberación sistémica de AVP no modifica la permeabilidad hacia el HMB, ya que se requiere de la señalización de AVP en los tanicitos que yacen en el 3V para modificar la glucemia, es aquí donde se encuentran las fibras de AVP que provienen del NSQ (**Rodríguez-Cortés 2022**) y donde la fructosa disminuye la expresión de GLUT1 (Fig. Res. 12).

Ahora bien, ¿cómo actúa la fructosa una vez que llega al HMB para inducir cambios en la expresión de GLUT1? Debido a que en otros trabajos se ha reportado que en el HMB se requiere de la señalización por AMPK para inducir cambios sobre la regulación de la glucemia por fructosa (**Kinote 2012; Faria 2018**), se aunarà a continuación sobre este mecanismo.

## *¿Cómo la fructosa induce cambios en la inmunoreactividad contra GLUT1?*

La disminución en la inmunoreactividad de GLUT1 es rápida, alrededor de 10 minutos post fructosa, por lo que es poco probable que se deba a un cambio en la degradación de la proteína. El anticuerpo anti-GLUT1 reconoce el carboxilo terminal de GLUT1, región que también esta sujeta a cambios post traduccionales como ubiquitinación ([phosphosite.org](http://phosphosite.org)), sugerimos que la ubiquitinación de GLUT1 podría esconder el epitope y disminuir la inmunoreactividad observados después de fructosa (Fig. Res. 12). Esta marca post traduccional es importante para favorecer la endocitosis de receptores mediada por alfa-arrestinas (**O'Donnell 2019**), estas proteínas se unen a los receptores membranales como GLUT1 y reclutan a otros complejos proteicos para ubiquitinar y endocitar a los receptores, disminuyendo p. ej. el transporte intracelular de glucosa. La actividad de las alfa-arrestinas se regula por fosforilación por algunas cinasas como AMPK (**Wu 2013**). ¿Cómo la fructosa podría inducir un cambio en la ubiquitinación de GLUT1? Como se ha mencionado anteriormente, la administración de fructosa activa AMPK en células del parénquima del HMB (**Kinote 2012; Faria 2018**), pero no se ha evaluado si también se recluta en tanicitos rápidamente. Igualmente faltaría evaluar si la administración de fructosa induce la endocitosis de GLUT1 en tanicitos, empleando otro anticuerpo que reconozca p. ej. su amino terminal (**Thermo Fisher Scientific Cat PA5-16793**). Hipotetizamos que la activación de AMPK por fructosa en tanicitos induciría la rápida internalización de GLUT1 por ubiquitinación y reduciría el transporte de glucosa.

## *Activación de gluconeogénesis hepática por fructosa*

Una vez que la fructosa modifica el transporte de glucosa al HMB, ¿qué mecanismos inducen la hiperglicemia observada? Los cambios en la glucosa a nivel del SNC son comunicados a los órganos a través del sistema nervioso simpático (SNS) (**Nagai 1996; Yamamoto 1988; Nakagawa 2010**) mediante la liberación de hormonas como glucagón y adrenalina que promueven la gluconeogénesis hepática (**Ruiter 2003**). Aquí observamos que la administración de fructosa no induce cambios agudos en la actividad locomotora, en la temperatura corporal, o frecuencia cardiaca (Fig. Res 4), sugiriendo que no se induce una respuesta generalizada de activación del SNS, faltaría evaluar si induce la liberación de adrenalina y glucagón indicando que se activa específicamente la proyección a la médula adrenal o al páncreas, respectivamente.

La hiperglicemia provocada por fructosa se podría deber a dos mecanismos: 1) incremento en la producción hepática de glucosa o 2) disminución en la captación de glucosa por otros tejidos p. ej. debido a una disminución en la insulina. Aquí observamos que la administración de fructosa después de un ayuno indujo una respuesta disminuida de hiperglicemia (Fig. Res 2), esto podría deberse a que los niveles ya bajos de reservas hepáticas (**Andersen 2011**) son incapaces de aumentar la glucemia, sugiriendo que la respuesta de hiperglicemia se debe a un incremento en la gluconeogénesis hepática (también sugerido por **Kinote 2012**), que durante el ayuno ya se encuentra incrementada (**Suda 1973**); faltaría evaluar si la administración de fructosa disminuye la liberación de insulina. También proponemos que la hiperglicemia por fructosa se podría deber a la activación simpática directa hacia el hígado, como lo demostrado para la rama del SNS que proyecta al hígado (**Kalsbeek 2004**), la cual pudiera involucrar la conexión polisináptica del ARC con el hígado (**la Fleur 2000; Stanley 2010**), y apoyar una vía directa para modificar la producción de glucosa por el HMB sin la intervención de hormonas como adrenalina y glucagón.

## *¿Qué implicaciones tiene la fructosa en el HMB sobre el desarrollo del SM?*

Los resultados de la administración por microdiálisis sugieren que la fructosa transportada al HMB induce hiperglicemia (Fig. Res. 7), lo cual concuerda con los cambios observados sobre la BHH y el transporte de glucosa. El SM podría ser causado por dietas altas en fructosa (**Cohen 1964**;

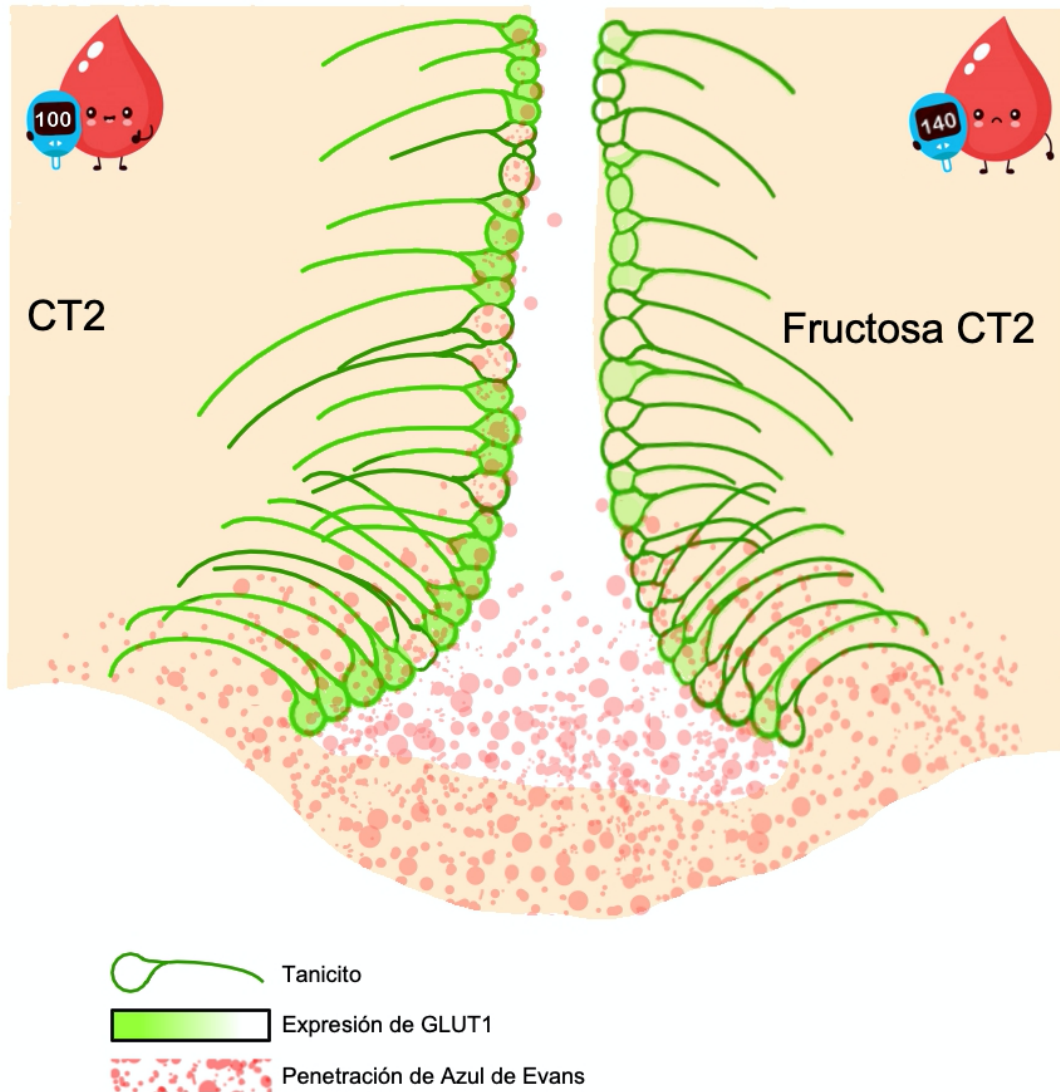
**Reaven 1979; Shamah-Levy 2021; Zararoni 1980**) que inducen hiperglicemia al disminuir el transporte de glucosa y permeabilidad de la BHH. Además, la administración de una dieta alta en fructosa ingerida en la fase de reposo, y no en la fase de actividad, es suficiente para inducir intolerancia a la glucosa (**Faria 2018**), lo cual concuerda con nuestros efectos observados solo en CT2 (Fig. Res. 1, 5, 11, 12).

La retroalimentación inducida por fructosa podría ser capaz de modificar la actividad rítmica del NSQ. El NSQ no solo recibe retroalimentación de la retina, sino también información metabólica y hormonal decodificada por el ARC (**Saderi 2013; Buijs 2017; Chun-Xia 2005, 2008**), del estado de ayuno por el núcleo integeniculado lateral (**Saderi 2013**), del apetito por el núcleo dorsomedial hipotalámico (**Acosta-Galvan 2011**), de la presión arterial por el núcleo del tracto solitario (**Buijs 2014**), y se ha sugerido que del sueño/vigilia por neuronas serotoninérgicas del núcleo del raquí mediano (**Hay-Schmidt 2003**). Se ha hipotetizado que esta retroalimentación es importante en el desarrollo de enfermedades metabólicas, ya que la incorrecta señalización genera lo que se conoce como desincronización o pérdida de los ritmos circadianos (**Buijs 2013; Turek 2008; Sabath 2015; Golombek 2013**), también observada en pacientes con SM o DT2 (**Peschke 2006; Ba-Ali 2019; Mäntele 2012; Crew 2018; Lederbogen 2011; Cano 2008; Shapiro 1991**). La desincronización se genera experimentalmente con luz constante, con luz tenue en la noche (**Fleury 2020; Opperhuizen 2017; Báez-Ruiz 2017; Kooijman 2015**), comer de día (**Salgado-Delgado 2013; Ramirez-Plascencia 2017; de Goede 2018**), señales en un momento del día erróneo. Se ha observado en humanos correlación entre comer en la tarde/noche y el desarrollo de DT2, obesidad, hígado graso y SM (**Færch 2020; Bo 2014**). Por el otro lado, la resincronización consiste en dar señales en acorde al momento del día como hormonas (**Báez-Ruiz 2017**) o muy interesantemente la sacarosa (**Escobar 2020**). Igualmente, en humanos se ha observado que dar un desayuno alto en calorías incrementa la sensibilidad a insulina (**Jakubowicz 2013**) y disminuye la hiperglucemia postprandial en personas con SM y DT2 (**Jakubowicz 2013, 2015**). Sugerimos que la señal que induce la fructosa se integra en el ARC y VMH y retroalimenta de vuelta al NSQ modificando su actividad (**Buijs 2017**) y promoviendo la desincronización, así pues, el consumo constante de azúcares simples (fructosa) durante la fase de reposo manda una señal discordante al NSQ lo cual termina ocasionando la pérdida y desorganización de los ritmos biológicos, promoviendo resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa en momentos del día que no son necesarios.

En conclusión, el consumo de fructosa dependiendo de la hora de ingesta podría disminuir el transporte de glucosa a través de los tanicitos, principalmente durante las horas de reposo. Esto sería interpretado por el HMB como una hipoglucemia e induciría una RCR aumentando la producción hepática de glucosa. Así pues, el consumo diario de fructosa en el descanso activa la gluconeogénesis en un momento del día que el organismo tiene poca sensibilidad a la insulina y no está preparado para gastar la glucosa, promoviendo así el desarrollo de enfermedades metabólicas como el SM. Además, esta respuesta podría retroalimentar al NSQ y modificar su actividad, favoreciendo la desincronización de los ritmos circadianos. La respuesta dinámica de la BHH podría ser un blanco terapéutico prometedor para manipular la retroalimentación que recibe el hipotálamo.

### Figura Resumen

Se observa que en condiciones normales en CT2 la expresión de GLUT1 y la permeabilidad del ARC es alta, lo cual permite que glucemia sea normal (alrededor de 100mg/dL), sin embargo, la administración aguda de fructosa disminuye tanto la inmunoreactividad de GLUT1 en tanicitos como la penetración de sustancias al 3V, lo cual activa la RCR induciendo un aumento en la glucemia, hasta 140mg/dL, esta respuesta continúa hasta que la fructosa desaparece de la circulación.





## REFERENCIAS

1. **Acosta-Galvan et al (2011)**. *Interaction between hypothalamic dorsomedial nucleus and the suprachiasmatic nucleus determines intensity of food anticipatory behavior*. PNAS 108 (14):5813–5818.
2. **Aguilar et al (2015)**. *Prevalence of the Metabolic Syndrome in the United States, 2003-2012*. JAMA 313(19):1973-1974.
3. **Alberti et al (2009)**. *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity*. Circulation 120:1640-1645.
4. **Andersen (2011)**. *Plasma FGF21 displays a circadian rhythm during a 72-h fast in healthy female volunteers*. Clin Endocrinol (Oxf) 75(4):514-9.
5. **Andres-Hernando et al (2020)**. *Deletion of Fructokinase in the Liver or in the Intestine Reveals Differential Effects on Sugar-Induced Metabolic Dysfunction*. Cell Metab 32(1):117-127.e3.
6. **Aaricio et al (1974)**. *Circadian variation of the blood glucose, plasma insulin and human growth hormone levels in response to an oral glucose load in normal subjects*. Diabetes 23(2):132-7.
7. **Ba-Ali et al (2019)**. *Assessment of diurnal melatonin, cortisol, activity, and sleep-wake cycle in patients with and without diabetic retinopathy*. Sleep Med. 54:35-42.
8. **Báez-Ruiz et al (2017)**. *Food in synchrony with melatonin and corticosterone relieves constant light disturbed metabolism*. J Endocrinol 235:167–178.
9. **Balland et al (2014)**. *Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain*. Cell Metabolism 19:293–301.
10. **Balland et al (2019)**. *Persistent Leptin Signaling in the Arcuate Nucleus Impairs Hypothalamic Insulin Signaling and Glucose Homeostasis in Obese Mice*. Neuroendocrinology 109(4):374-390.
11. **Balthasar et al (2005)**. *Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure*. Cell 123(3):493-505.
12. **Becskei et al (2008)**. *Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice*. Neuroreport 19(1):105-109.
13. **Blair et al (1996)**. *Hepatic Gluconeogenesis and the Activity of PDH in Individual Tissues of GTG-Obese Mice Following Adrenalectomy*. Obes Res 4(4).
14. **Bo et al (2014)**. *Consuming More of Daily Caloric Intake at Dinner Predisposes to Obesity. A 6-Year Population-Based Prospective Cohort Study*. PLoS One, Volume 9, Issue 9, e108467.
15. **Bolborea et al (2020)**. *Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network*. Proc Natl Acad Sci U S A 117(25):14473-14481.
16. **Bourque (2008)**. *Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation*. Nat Rev Neurosci 9(7):519-31.
17. **Brown et al (2008)**. *Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294(3): R730-7.
18. **Buijs (1996)**. *The anatomical basis for the expression of circadian rhythms: the efferent projections of the suprachiasmatic nucleus*. Prog in Brain Res 111:229-40.
19. **Buijs (2013)**. *The circadian system and the balance of the autonomic nervous system*. Handbook of Clinical Neurology, Vol. 117 (3rd series) Autonomic Nervous System
20. **Buijs et al (2014)**. *The suprachiasmatic nucleus is part of a neural feedback circuit adapting blood pressure response*. Neuroscience 266:197-207.
21. **Buijs et al (2017)**. *Suprachiasmatic Nucleus Interaction with the Arcuate Nucleus; Essential for Organizing Physiological Rhythms*. eNeuro 4(2):ENEURO.0028-17.
22. **Buñag et al (1982)**. *Chronic Sucrose Ingestion Induces Mild Hypertension and Tachycardia in Rat*. Hypertension 5: 218-225.
23. **Cailotto et al (2008)**. *Daily Rhythms in Metabolic Liver Enzymes and Plasma Glucose Require a Balance in the Autonomic Output to the Liver*. Endocrinology 149(4):1914–1925

24. **Cano et al (2008)**. *Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats*. *Endocrine*. 33(2):118-25.
25. **Caron et al (2018)**. *Leptin and brain–adipose crosstalks*. *Nat Rev Neurosci* 19(3):153-165.
26. **Carranza & López (2008)**. *El síndrome metabólico en México*. *Med Int Mex* 24(4):251-61.
27. **Carroll & Nestel (1973)**. *Diurnal variation in glucose tolerance and in insulin secretion in man*. *Diabetes* 22(5):333-48.
28. **Cha et al (2008)**. *Differential effects of central fructose and glucose on hypothalamic malonyl–CoA and food intake*. *PNAS* 105 (44) 16871-16875.
29. **Chen et al (2015)**. *Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits*. *Cell* 160:829-841.
30. **Chun-Xia et al (2005)**. *Ventromedial Arcuate Nucleus Communicates Peripheral Metabolic Information to the Suprachiasmatic Nucleus*. *Endocrinology* 147(1):283-294.
31. **Chun-Xia et al (2008)**. *A circulating ghrelin mimetic attenuates light-induced phase delay of mice and light-induced Fos expression in the suprachiasmatic nucleus of rats*. *Eur J Neurosci* 27:1965-1972.
32. **Cicerchi et al (2014)**. *Uric acid-dependent inhibition of AMP kinase induces hepatic glucose production in diabetes and starvation: evolutionary implications of the uricase loss in hominids*. *FASEB J* 28(8):3339-3350.
33. **Ciofi (2011)**. *The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse*. *Neurosci Lett* 487(2):187-90.
34. **Coelho et al (2020)**. *Short-Communication: Ingestion of a Nucleotide- Rich Mixed Meal Increases Serum Uric Acid Concentrations but Does Not Affect Postprandial Blood Glucose or Serum Insulin Responses in Young Adults*. *Nutrients* 12(4):1115.
35. **Cohen et al (1964)**. *EFFECT OF DIETARY SUCROSE AND STARCH ON ORAL GLUCOSE TOLERANCE AND INSULIN-LIKE ACTIVITY*. *Am J Physiol* 206:105-8.
36. **Cohen et al (1972)**. *Effect of Longterm Sucrose Feeding on the Activity of Some Enzymes Regulating Glycolysis, Lipogenesis and Gluconeogenesis in Rat Liver and Adipose Tissue*. *Biochim Biophys Acta* 279(1):129-38.
37. **Cowley et al (2001)**. *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. *Nature* 411(6836):480-4.
38. **Crew et al (2018)**. *Diet-induced obesity reduces core body temperature across the estrous cycle and pregnancy in the rat*. *Chronobiol Int.* 35(8):1077-1087.
39. **De Goede et al (2018)**. *Differential effects of diet composition and timing of feeding behavior on rat brown adipose tissue and skeletal muscle peripheral clocks*. *Neurobiol Sleep Circadian Rhythms* 4:24–33.
40. **De Goede et al (2019)**. *Time-Restricted Feeding Improves Glucose Tolerance in Rats, but Only When in Line With the Circadian Timing System*. *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:554.
41. **Delbosc et al (2005)**. *Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat*. *Atherosclerosis* 179: 43-49.
42. **Després & Lemieux (2006)**. *Abdominal obesity and metabolic syndrome*. *Nature* 444(7121):881-7.
43. **Djogo et al (2016)**. *Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence- Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control*. *Cell Metab* 23:797–810.
44. **Duquenne et al (2021)**. *Leptin brain entry via a tancytic LepR-EGFR shuttle controls lipid metabolism and pancreas function*. *Nat Metab.* 3(8):1071-1090.
45. **Eckel et al (2005)**. *The metabolic syndrome*. *Lancet* 365:1415–28.
46. **Eigler et al (1979)**. *Synergistic Interactions of Physiologic Increments of Glucagon, Epinephrine, and Cortisol in the Dog*. *J Clin Invest* 63:114-123.
47. **Elias et al (1998)**. *Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord*. *Neuron*. 21(6):1375-85.

48. **Elizondo-Vega et al (2015)**. *The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing*. *J. Cell. Mol. Med* 19(7):1471-1482.
49. **Elmqvist et al (2005)**. *Identifying Hypothalamic Pathways Controlling Food Intake, Body Weight, and Glucose Homeostasis*. *J. Comp. Neurol* 493:63–71.
50. **Escobar et al (2020)**. *Chocolate for breakfast prevents circadian desynchrony in experimental models of jet-lag and shift-work*. *Sci Rep* 10(1):6243.
51. **Faber et al (2018)**. *Distinct Neuronal Projections From the Hypothalamic Ventromedial Nucleus Mediate Glycemic and Behavioral Effects*. *Diabetes* 67:2518–2529.
52. **Faeh et al (2005)**. *Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men*. *Diabetes* 54(7):1907-13.
53. **Færch et al (2020)**. *Prospective association between late evening food consumption and risk of prediabetes and diabetes: the Whitehall II cohort study*. *Diabet Med* 36(10):1256-1260.
54. **Faria et al (2017)**. *Metabolic Impact of Light Phase-Restricted Fructose Consumption Is Linked to Changes in Hypothalamic AMPK Phosphorylation and Melatonin Production in Rats*. *Nutrients* 9(4):332.
55. **Fenselau et al (2017)**. *A rapidly acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by  $\alpha$ -MSH*. *Nat Neurosci* 20(1):42-51.
56. **Fioramonti et al (2004)**. *A New ATP-Sensitive K Channel–Independent Mechanism Is Involved in Glucose-Excited Neurons of Mouse Arcuate Nucleus*. *Diabetes* 53:2767–2775.
57. **Fioramonti et al (2010)**. *Ventromedial Hypothalamic Nitric Oxide Production Is Necessary for Hypoglycemia Detection and Counterregulation*. *Diabetes* 59:519–528.
58. **Fleury et al (2020)**. *Metabolic Implications of Exposure to Light at Night: Lessons from Animal and Human Studies*. *Obesity (Silver Spring)* 28(Suppl 1): S18–S28.
59. **Ford et al (2008)**. *Metabolic Syndrome and Incident Diabetes*. *Diab Care* 31:1898–1904.
60. **Fox & Kelley (1972)**. *Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in man*. *Metabolism* 21(8):713–721.
61. **Frayling et al (2011)**. *ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes*. *J Physiol* 589:2275–2286.
62. **Fujikawa & Coppari (2015)**. *Living without insulin: the role of leptin signaling in the hypothalamus*. *Front Neurosci* 9:108.
63. **Gabriely et al (2002)**. *Fructose amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia in humans*. *Diabetes* 51(4):893-900.
64. **Garcia (2001)**. *Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier*. *J Cell Biochem* 80(4):491-503.
65. **Garcia & Shaw (2017)**. *AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance*. *Mol Cell* 66(6):789-800.
66. **García-Arroyo et al (2017)**. *Vasopressin Mediates the Renal Damage Induced by Limited Fructose Rehydration in Recurrently Dehydrated Rats*. *Int J Biol Sci* 13(8):961-975.
67. **Garfield et al (2014)**. *A parabrachial-hypothalamic cholecystokinin neurocircuit controls counterregulatory responses to hypoglycemia*. *Cell Metab* 20(6):1030-7.
68. **Gaysinskaya et al (2011)**. *Hyperphagia induced by sucrose: relation to circulating and CSF glucose and corticosterone and orexigenic peptides in the arcuate nucleus*. *Pharmacol Biochem Behav* 97(3):521-30.
69. **Gizowski et al (2016)**. *Clock-driven vasopressin neurotransmission mediates anticipatory thirst prior to sleep*. *Nature* 537(7622):685-8.
70. **Go et al (2013)**. *Heart Disease and Stroke Statistics—2014 Update A Report From the American Heart Association*. *Circulation* 129:e28-e292.
71. **Golombek et al (2013)**. *The times they're a-changing: effects of circadian desynchronization on physiology and disease*. *J Physiol Paris* 107(4):310-22.
72. **Grosbellet et al (2015)**. *Leptin modulates the daily rhythmicity of blood glucose*. *Chronobiol Int* 32(5):637-649.

73. **Guzmán-Ruiz et al (2015)**. *Role of the Suprachiasmatic and Arcuate Nuclei in Diurnal Temperature Regulation in the Rat*. J Neurosci 35(46):15419-29.
74. **Hahn et al (1998)**. *Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons*. Nat Neurosci 1(4) 271-2.
75. **Hannibal et al (1997)**. *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP) in the Retinohypothalamic Tract: A Potential Daytime Regulator of the Biological Clock*. J Neurosci 17(7):2637–2644.
76. **Hannou et al (2018)**. *Fructose metabolism and metabolic disease*. J Clin Invest 128(2):545–555.
77. **Hattar et al (2006)**. *Central Projections of Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion Cells in the Mouse*. J Comp Neurol 497(3):326–349.
78. **Hay-Schmidt et al (2003)**. *Projections from the raphe nuclei to the suprachiasmatic nucleus of the rat*. J Chem Neuroanat 25(4):293-310.
79. **Herrera-Moro et al (2016)**. *The Suprachiasmatic Nucleus Modulates the Sensitivity of Arcuate Nucleus to Hypoglycemia in the Male Rat*. Endocrinology 157: 3439–3451.
80. **Hirschberg et al (2020)**. *Ventromedial hypothalamus glucose-inhibited neurones: A role in glucose and energy homeostasis?* J Neuroendocrinol 32(1): e12773.
81. **Hladky & Barrand (2014)**. *Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence*. Fluids Barriers CNS 11(1):26
82. **Hofer (1958)**. *"Zur Morphologie der circumventriculären Organe des Zwischenhirns der Säugetiere"*. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 55: 202–251.
83. **Homma et al (2006)**. *Differential Response of Arcuate Proopiomelanocortin- and Neuropeptide Y-Containing Neurons to the Lesion Produced by Gold Thioglucose Administration*. J Comp Neurol 499:120–131.
84. **Huang et al (2016)**. *Association of the serum uric acid level with liver histology in biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease*. Biomed Rep 5(2):188-192.
85. **Ibrahim et al (2003)**. *Hypothalamic Proopiomelanocortin Neurons Are Glucose Responsive and Express KATP Channels*. Endocrinology 144(4):1331–1340
86. **INEGI (2021, 28 de octubre)**. *CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2020*. Comunicado en prensa.  
<https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2021/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2020preliminar.pdf>
87. **INEGI-INSP (2019)**. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 Ensanut – Informe Operativo*. INEGI. En prensa
88. **Jakubowicz et al (2013)**. *High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women*. Obesity (Silver Spring). 21(12):2504-12.
89. **Jakubowicz et al (2015)**. *High-energy breakfast with low-energy dinner decreases overall daily hyperglycaemia in type 2 diabetic patients: a randomised clinical trial*. Diabetologia 58(5):912-9.
90. **Jarrett & Keen (1969)**. *Diurnal variation of oral glucose tolerance: a possible pointer to the evolution of diabetes mellitus*. Br Med J. 2(5653):341-4.
91. **Jenkins et al (2021)**. *Glycemic Index, Glycemic Load, and Cardiovascular Disease and Mortality*. N Engl J Med 384(14):1312-1322.
92. **Johnson et al (2007)**. *Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr 86:899–906
93. **Jürgens et al (2005)**. *Consuming Fructose-sweetened Beverages Increases Body Adiposity in Mice*. Obes Res 13(7): 1146-56.
94. **Kajihara et al (2017)**. *Low glucose induces mitochondrial reactive oxygen species via fatty acid oxidation in bovine aortic endothelial cells*. J Diabetes Investig 8(6):750-761.
95. **Kalsbeek et al (1995)**. *In vivo measurement of a diurnal variation in vasopressin release in the rat suprachiasmatic nucleus*. Brain Res 682(1-2):75-82.
96. **Kalsbeek et al (1996)**. *A diurnal rhythm of stimulatory input to the hypothalamo-pituitary-adrenal system as revealed by timed intrahypothalamic administration of the vasopressin V1 antagonist*. J 16(17):5555-65.

97. **Kalsbeek et al (2004)**. *Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver*. *J Neurosci* 24(35):7604-13.
98. **Kearns et al (2017)**. *Sugar Industry and Coronary Heart Disease Research A Historical Analysis of Internal Industry Documents*. *PLoS Biol* 15(11):e2003460.
99. **Keys (1975)**. *Coronary heart disease — The global picture*. *Atherosclerosis* 22(2):149-92.
100. **Kida et al (1980)**. *The circadian change of gluconeogenesis in the liver in vivo in fed rats*. *J Biochem* 88(4):1009-13.
101. **King (1988)**. *Glucocorticoids and Hypothalamic Obesity*. *Neurosci Biobehav Rev* 12(1):29–37.
102. **Kinote et al (2012)**. *Fructose-Induced Hypothalamic AMPK Activation Stimulates Hepatic PEPCK and Gluconeogenesis due to Increased Corticosterone Levels*. *Endocrinology* 153:3633–3645.
103. **Kojo, Yamada, Yamamoto (2016)**. *Glucose transporter 5 (GLUT5)-like immunoreactivity is localized in subsets of neurons and glia in the rat brain*. *J Chem Neuroanat* 74:55-70.
104. **Kooijman et al (2015)**. *Prolonged daily light exposure increases body fat mass through attenuation of brown adipose tissue activity*. *PNAS* 112(21):6748-53
105. **Koronowski et al (2019)**. *Defining the Independence of the Liver Circadian Clock*. *Cell* 177(6):1448-1462.e14
106. **Kratzer et al (2014)**. *Evolutionary history and metabolic insights of ancient mammalian uricases*. *PNAS* 111(10):3763-8
107. **Kurita et al (2015)**. *Arcuate Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase senses systemic energy states and regulates feeding behavior through glucose-inhibited neurons*. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E320–E333.
108. **Kuwabara et al (2017)**. *Asymptomatic Hyperuricemia without Comorbidities Predicts Cardiometabolic Diseases: 5-year Japanese Cohort Study*. *Hypertension* 69(6):1036–1044.
109. **la Fleur et al (2000)**. *Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver*. *Brain Res*. 871(1):50-6.
110. **la Fleur et al (2001)**. *A daily rhythm in glucose tolerance: a role for the suprachiasmatic nucleus*. *Diabetes*. 50(6):1237-43.
111. **Lam et al (2005a)**. *Regulation of Blood Glucose by Hypothalamic Pyruvate Metabolism*. *Science* 309(5736):943-947
112. **Lam et al (2005b)**. *Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis*. *Nat Med* 11(3):320-7.
113. **Lam, Schwartz, Rossetti (2005c)**. *Hypothalamic sensing of fatty acids*. *Nat Neurosci* 8(5):579-84
114. **Lamia et al (2011)**. *Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor*. *Nature* 480(7378):552-6
115. **Lanaspa et al (2012)**. *Uric Acid Induces Hepatic Steatosis by Generation of Mitochondrial Oxidative Stress*. *J Biol Chem* 287(48): 40732–40744.
116. **Lanaspa et al (2018)**. *High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism*. *PNAS* 115(12):3138–3143.
117. **Langlet et al (2013a)**. *Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting*. *Cell Metab* 17:607–617.
118. **Langlet et al (2013b)**. *Tanycyte-Like Cells Form a Blood–Cerebrospinal Fluid Barrier in the Circumventricular Organs of the Mouse Brain*. *J Comp Neurol* 521(15):3389-405
119. **Le et al (2012)**. *Effects of high-fructose corn syrup and sucrose on the pharmacokinetics of fructose and acute metabolic and hemodynamic responses in healthy subjects*. *Metabolism* 61(5):641-51.
120. **Lê & Tappy (2006)**. *Metabolic effects of fructose*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:469–475.

121. **Lederbogen et al (2011).** *Flattened circadian cortisol rhythm in type 2 diabetes.* Exp Clin Endocrinol Diabetes. 119(9):573-5.
122. **Lhomme et al (2021).** *Tanycytic networks mediate energy balance by feeding lactate to glucose-insensitive POMC neurons.* J Clin Invest 131(18):e140521.
123. **Li et al (2018).** *Paeoniflorin Ameliorates Fructose-Induced Insulin Resistance and Hepatic Steatosis by Activating LKB1/AMPK and AKT Pathways.* Nutrients 10(8):1024
124. **Li, Zhang, Lam (2020).** *Interaction of glucose sensing and leptin action in the brain.* Mol Metab 39:101011
125. **López-Gambero et al (2018).** *Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis.* Molecular Neurobiology. Mol Neurobiol 56(2):769-796.
126. **Lüscher et al (2017).** *From Eisenhower's heart attack to modern management: a true success story!* Eur Heart J 38(41): 3066–3069.
127. **Mäntele et al (2012).** *Daily rhythms of plasma melatonin, but not plasma leptin or leptin mRNA, vary between lean, obese and type 2 diabetic men.* PLoS One. 7(5):e37123.
128. **Martinez et al (1994).** *High-Fructose Feeding Elicits Insulin Resistance, Hyperinsulinism, and Hypertension in Normal Mongrel Dogs.* Hypertension 3:456-4
129. **Martínez et al (2019).** *The median eminence as the hypothalamic area involved in rapid transfer of glucose to the brain: functional and cellular mechanisms.* J Mol Med 97:1085–1097.
130. **Martínez Gómez (2019).** *Influencia de la síntesis de prostaglandinas sobre la permeabilidad de los Órganos circunventriculares.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
131. **McCrimmon et al (2008).** *Key Role for AMP-Activated Protein Kinase in the Ventromedial Hypothalamus in Regulating Counterregulatory Hormone Responses to Acute Hypoglycemia.* Diabetes 57:444–450.
132. **McGandy et al (1967).** *Dietary fats, carbohydrates and atherosclerotic vascular disease.* N Engl J Med. 277(4):186-192.
133. **McKinley et al (2008).** *Osmoregulatory fluid intake but not hypovolemic thirst is intact in mice lacking angiotensin.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294(5):R1533-43.
134. **Meek et al (2015).** *Functional identification of a neurocircuit regulating blood glucose.* PNAS 113(14):E2073-82.
135. **Morita & Miyata (2013).** *Accessibility of low-molecular-mass molecules to the median eminence and arcuate hypothalamic nucleus of adult mouse.* Cell Biochem Funct 31(8):668-77.
136. **Morita, Hourai, Miyata (2014).** *Changes in pericytic expression of NG2 and PDGFRB and vascular permeability in the sensory circumventricular organs of adult mouse by osmotic stimulation.* Cell Biochem Funct 32(1):51-61.
137. **Müller-Fielitz et al (2017).** *Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis.* Nat Comm 8(1):484.
138. **Mullier et al (2010).** *Differential Distribution of Tight Junction Proteins Suggests a Role for Tanycytes in Blood-Hypothalamus Barrier Regulation in the Adult Mouse Brain.* J Comp Neurol 518:943–962
139. **Murphy et al (2009a).** *AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons.* Am J Physiol Cell Physiol 297: C750–C758
140. **Murphy et al (2009b).** *Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose.* Am J Physiol Cell Physiol 296: C746–C756.
141. **Nagai, Inoue, Nakagawa (1983).** *Reciprocal changes in gluconeogenic enzyme activity in liver and kidney by VMH lesion.* Am J Physiol 245(1):E14-8.
142. **Nagai et al (1996).** *SCN output drives the autonomic nervous system: with special reference to the autonomic function related to the regulation of glucose metabolism.* Prog Brain Res. 111:253-72.
143. **Nakagawa et al (2005).** *Hypothesis: fructose-induced hyperuricemia as a causal mechanism for the epidemic of the metabolic syndrome.* Nat Clin Pract Nephrol 1(2):80-6.

144. **Nakagawa et al (2006).** *A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome.* Am J Physiol Renal Physiol 290: F625–F631.
145. **Nakagawa, Okumura (2010).** *Coordinated regulation of circadian rhythms and homeostasis by the suprachiasmatic nucleus.* Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 86(4):391-409.
146. **O'Donnell & Schmidt (2019).** *AMPK-Mediated Regulation of Alpha-Arrestins and Protein Trafficking.* Int J Mol Sci 20(3):515.
147. **Opperhuizen et al (2017).** *Light at night acutely impairs glucose tolerance in a time-, intensity- and wavelength-dependent manner in rats.* Diabetologia 60(7): 1333–1343.
148. **Parton et al (2007).** *Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity.* Nature 449:228–232.
149. **Paxinos & Watson (2013).** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates:* Hard Cover Edition. Elsevier Science.
150. **Pedroza-Tobias et al (2014).** *Classification of metabolic syndrome according to lipid alterations: analysis from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006.* BMC Public Health 14:1056.
151. **Peschke et al (2006).** *Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status.* J Pineal Res. 40(2):135-43
152. **Pett et al (2017).** *Ancel Keys and the Seven Countries Study: An Evidence-based Response to Revisionist Histories.* WHITE PAPER Commissioned by The True Health Initiative, with emphasis on primary source material, historical records, and review/critique by Seven Countries Study Investigators. <http://www.truehealthinitiative.org/>.
153. **Pocai et al (2005).** *Hypothalamic K channels control ATP hepatic glucose production.* Nature 434(7036):1026-31
154. **Preston & Calle (2010).** *Elevated Serum Sorbitol and not Fructose in Type 2 Diabetic Patients.* Biomark Insights 5:33–38.
155. **Prevot et al (2003).** *Activation of erbB-1 Signaling in Tanycytes of the Median Eminence Stimulates Transforming Growth Factor 1 Release via Prostaglandin E2 Production and Induces Cell Plasticity.* J Neurosci 23(33):10622–10632.
156. **Prevot et al (2018).** *The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism.* Endocr Rev 39(3):333 – 368.
157. **Porniece Kumar et al (2021).** *Insulin signalling in tanycytes gates hypothalamic insulin uptake and regulation of AgRP neuron activity.* Nat Metab 3(12):1662–1679.
158. **Ramirez-Plascencia et al (2017).** *Feeding during the rest phase promotes circadian conflict in nuclei that control energy homeostasis and sleep–wake cycle in rats.* Eur J Neurosci 45:1325–1332.
159. **Reaven et al (1979).** *Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats.* J Lipid Res 20: 371-378.
160. **Refinetti et al (1995).** *Effects of Suprachiasmatic Lesions on Temperature Regulation in the Golden Hamster.* Brain Res Bull 36(1):81-84.
161. **Rijnsburger et al (2019).** *One-week exposure to a free-choice high-fat high-sugar diet does not disrupt blood-brain barrier permeability in fed or overnight fasted rats.* Nutr Neurosci 22(8):541-550.
162. **Rodríguez et al (2005).** *Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction.* Int Rev Cytol 247:89-164.
163. **Rodríguez-Cortés (2017).** *Influencias metabólicas y circadianas sobre el núcleo arqueado (Tesis de pregrado).* Universidad Nacional Autónoma de México. México.
164. **Rodríguez-Cortés et al (2022).** *Suprachiasmatic nucleus-mediated glucose entry into the arcuate nucleus determines the daily rhythm in blood glycemia.* Curr Biol 32(4):796-805.e4.
165. **Roncal Jimenez et al (2014).** *Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury.* Kidney Int 86:294–302.
166. **Routh (2010).** *Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus.* Sensors (Basel) 10(10):9002-9025.

167. **Ruiter et al (2003).** *The Daily Rhythm in Plasma Glucagon Concentrations in the Rat Is Modulated by the Biological Clock and by Feeding Behavior.* Diabetes 52:1709–1715.
168. **Sabath et al (2015).** *Non-alcoholic fatty liver disease as a consequence of autonomic imbalance and circadian desynchronization.* Obes Rev 16:871–882.
169. **Saderi et al (2013).** *The NPY intergeniculate leaflet projections to the suprachiasmatic nucleus transmit metabolic conditions.* Neuroscience 246:291-300.
170. **Salavert & Iynedjian (1982).** *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) synthesis in rat liver cells. Rapid induction of specific mRNA by glucagon or cyclic AMP and permissive effect of dexamethasone.* J Biol Chem 257(22):13404-12.
171. **Salgado-Delgado et al (2008).** *Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats.* Neuroscience 154:922–931.
172. **Salgado-Delgado et al (2013).** *Shift Work or Food Intake during the Rest Phase Promotes Metabolic Disruption and Desynchrony of Liver Genes in Male Rats.* PLoS ONE 8(4): e60052.
173. **Sanchez-Lozada et al (2019).** *Uric acid activates aldose reductase and the polyol pathway for endogenous fructose and fat production causing development of fatty liver in rats.* J. Biol. Chem 294(11):4272–4281
174. **Sano et al (1995).** *Effects of Suprachiasmatic lesions on circadian rhythms of blood pressure, heart rate and locomotor activity in the rat.* Jpn Circ J 59(8):565-73.
175. **Scheer et al (2005).** *Environmental light and suprachiasmatic nucleus interact in the regulation of body temperature.* Neuroscience 132(2):465-77.
176. **Schonfeld & Reiser (2013).** *Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? - Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain.* J Cereb Blood Flow Metab 33:1493–1499.
177. **Schwartz & Reppert (1985).** *Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei.* J Neurosci 5(10):2771-8.
178. **Schwarz et al (1992).** *Thermogenesis and fructose metabolism in humans.* Am J Physiol Endocrinol Metab 262: E591–E598.
179. **Schwarz (2015).** *Effect of a High-Fructose Weight-Maintaining Diet on Lipogenesis and Liver Fat.* J Clin Endocrinol Metab 100(6):2434-42.
180. **Shamah-Levy et al 2021.** *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2020 sobre Covid-19. Resultados nacionales.* Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.
181. **Shan et al (2020).** *Dual-Color Single-Cell Imaging of the Suprachiasmatic Nucleus Reveals a Circadian Role in Network Synchrony.* Neuron 108(1):164-179.e7.
182. **Shapiro et al (1991).** *Nocturnal elevation of glucose levels during fasting in noninsulin-dependent diabetes.* J Clin Endocrinol Metab 72(2):444-54.
183. **Shi et al (2013).** *Arcuate NPY Controls Sympathetic Output and BAT Function via a Relay of Tyrosine Hydroxylase Neurons in the PVN.* Cell Metab 17: 236–248.
184. **Shimizu et al (2008).** *Glucocorticoids Increase Neuropeptide Y and Agouti-Related Peptide Gene Expression via Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Signaling in the Arcuate Nucleus of Rats.* Endocrinology 149(9):4544–4553.
185. **Shin et al (2013).** *Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness.* J Diabetes Invest 4(4):334-43.
186. **Sisó et al (2010).** *Sensory circumventricular organs in health and disease.* Acta Neuropathol 120(6):689-705.
187. **Softic et al (2017).** *Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling.* J Clin Invest 127(11):4059–4074.
188. **Softic et al (2020).** *Fructose and hepatic insulin resistance.* Crit Rev Clin Lab Sci 57(5):308-322.
189. **Song et al (2016).** *Role of fructose and fructokinase in acute dehydration-induced vasopressin gene expression and secretion in mice.* J Neurophysiol 117: 646–654.
190. **Song & Routh (2016).** *Recurrent hypoglycemia reduces the glucose sensitivity of glucose-inhibited neurons in the ventromedial hypothalamus nucleus.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 291: R1283–R1287



191. **Stanhope et al (2009).** *Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans.* J. Clin. Invest. 119:1322–1334
192. **Stanley et al (2010).** *Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically.* 107(15):7024-9.
193. **Stern et al (2004).** *Does the Metabolic Syndrome Improve Identification of Individuals at Risk of Type 2 Diabetes and/or Cardiovascular Disease?* Diab Care 27:2676–2681.
194. **Stirpe et al (1970).** *FRUCTOSE-INDUCED HYPERURICÆMIA.* Lancet 296(7686):1310–1311.
195. **Suda, Nagai, Nakagawa (1973).** *Studies on the circadian rhythm of phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in rats. I. Mechanism of circadian increase in liver enzyme with special reference to hormonal and dietary effects.* J Biochem 73(4):727-38.
196. **Sugimoto et a (2010).** *Eucalyptus Leaf Extract Suppresses the Postprandial Elevation of Portal, Cardiac and Peripheral Fructose Concentrations After Sucrose Ingestion in Rats.* J Clin Biochem Nutr 46(3):205-11.
197. **Taghibiglou et al (1999).** *Mechanisms of Hepatic Very Low Density Lipoprotein Overproduction in Insulin Resistance EVIDENCE FOR ENHANCED LIPOPROTEIN ASSEMBLY, REDUCED INTRACELLULAR ApoB DEGRADATION, AND INCREASED MICROSOMAL TRIGLYCERIDE TRANSFER PROTEIN IN A FRUCTOSE-FED HAMSTER MODEL.* J Biol Chem 275(12):8416–8425.
198. **Temple (2018).** *Fat, Sugar, Whole Grains and Heart Disease: 50 Years of Confusion.* Nutrients 10(1):39.
199. **Thorens (2022).** *Neuronal regulation of glucagon secretion and gluconeogenesis.* J Diabetes Investig.
200. **Todd et al (2018).** *A hypothalamic circuit for the circadian control of aggression.* Nat Neurosci 21(5):717-724.
201. **Turek et al (2008).** *Staying off the dance floor: when no rhythm is better than bad rhythm.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294: R1672–R1674.
202. **Uranga et al (2017).** *Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior.* Sci Rep 7: 3697.
203. **Van Dam et al (2020).** *Sugar-Induced Obesity and Insulin Resistance Are Uncoupled from Shortened Survival in Drosophila.* Cell Metab 31(4):710-725.e7
204. **Vrang et al (1999).** *Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons.* J Neurosci 19(10):RC5.
205. **Villegas et al (2018).** *Effects of fructose-containing sweeteners on fructose intestinal, hepatic, and oral bioavailability in dual-catheterized rats.* PloS one 13(11):e0207024.
206. **Wang et al (2004).** *The Regulation of Glucose-Excited Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus by Glucose and Feeding-Relevant Peptides.* Diabetes 53:1959–1965.
207. **Wang et al (2013).** *Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin.* Mol. Met. 3:64–72.
208. **Weil-Malherbe & Bone (1954).** *The effect of glucose and fructose ingestion on the adrenaline and noradrenaline levels in human plasma.* J Endocrinol 11(3):298-303.
209. **Whichelow et al (1974).** *Diurnal variation in response to intravenous glucose.* Br Med J. 1(5906):488-91.
210. **Wolf et al (1992).** *Influence of Hypertonic Monosaccharide Infusions on the Release of Plasma Arginine Vasopressin in Normal Humans.* Horm Metab Res 24:379-98
211. **Woods et al (2017).** *Liver-Specific Activation of AMPK Prevents Steatosis on a High-Fructose Diet.* Cell Rep 18:3043–3051.
212. **Wu et al (2013).** *AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1.* Mol Cell 49(6):1167-75.
213. **Xu et al (2018).** *Genetic identification of leptin neural circuits in energy and glucose homeostases.* Nature 556(7702):505-509.

214. **Xu et al (2019)**. *Etiology of Metabolic Syndrome and Dietary Intervention*. *Int J Mol Sci* 20(1):128
215. **Yamamoto et al (1983)**. *ROLE OF CATECHOLAMINE IN TIME-DEPENDENT HYPERGLYCEMIA DUE TO 2-DEOXYGLUCOSE, MANNITOL, AND GLUCOSE*. *Biomed Res* 4(5):505-514
216. **Yamamoto et al (1987)**. *Role of SCN in daily rhythms of plasma glucose, FFA, insulin and glucagon*. *Chronobiol Int* 4(4): 483-91.
217. **Yamamoto, Nagai, Nakagawa (1988)**. *Time-dependent involvement of autonomic nervous system in hyperglycemia due to 2-deoxy-D-glucose*. *Am J Physiol* 255(6 Pt 1):E928-33.
218. **Yang et al (1999)**. *Hypothalamic Glucose Sensor Similarities to and Differences From Pancreatic -Cell Mechanisms*. *Diabetes* 48:1763 –1772
219. **Yoo et al (2019)**. *Tanycyte-Independent Control of Hypothalamic Leptin Signaling*. *Front Neurosci* 13:240
220. **Yudkin (1957)**. *DIET AND CORONARY THROMBOSIS*. *Lancet* 270(6987):155–162.
221. **Yudkin (1963)**. *Dietary carbohydrate and ischemic heart disease*. *Am Heart J* 66(6):835–836.
222. **Yudkin, & Roddy. (1964)**. *LEVELS OF DIETARY SUCROSE IN PATIENTS WITH OCCLUSIVE ATHEROSCLEROTIC DISEASE*. *Lancet* 284(7349):6–8
223. **Yulyaningsih et al (2017)**. *Acute Lesioning and Rapid Repair of Hypothalamic Neurons outside the Blood-Brain Barrier*. *Cell Reports* 19: 2257–2271
224. **Zavaroni et al (1980)**. *Effect of Fructose Feeding on Insulin Secretion and Insulin Action in the Rat*. *Metabolism* 29(10):970-3
225. **Zhao et al (2019)**. *Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review)*. *Int J Mol Med* 44(1):3-15.
226. **Zimmerman et al (2016)**. *Thirst neurons anticipate the homeostatic consequences of eating and drinking*. *Nature* 537(7622):680-684.
227. **Zimmet et al (1974)**. *Diurnal variation in glucose tolerance: associated changes in plasma insulin, growth hormone, and non-esterified fatty acids*. *Br Med J.* 1(5906):485-8.
228. **Zong et al (2020)**. *Correlation Between Serum Uric Acid Level and Central Body Fat Distribution in Patients with Type 2 Diabetes*. *Diabetes Metab Syndr Obes* 13:2521–2531.