

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

DIFERENCIAS EN POBLACIONES CELULARES HIPOTALÁMICAS RELACIONADAS
CON LA CONDUCTA ALIMENTICIA ENTRE SUJETOS CON ALTO Y BAJO PESO

Que presenta

JORGE MIGUEL ÁNGEL AMAYA FERNÁNDEZ

Para obtener el título de Licenciado en Psicología

Director de tesis:
Carolina Escobar Briones



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	4
2. RESUMEN.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....	6
Variabilidad en el desarrollo de obesidad.....	6
Relevancia del hipotálamo para mantener el peso corporal.....	7
El hipotálamo.....	8
El hipotálamo regula la homeostasis.....	10
El núcleo arqueado (ARC)	11
<i>Función del α-MSH.....</i>	<i>12</i>
<i>Función del NPY.....</i>	<i>13</i>
Hipotálamo Lateral (LH)	15
<i>Función del MCH.....</i>	<i>15</i>
<i>Función de las Orexinas.....</i>	<i>18</i>
Circuitos hipotalámicos para regular el peso corporal.....	19
Bases fisiológicas de la propensión y resistencia a la obesidad.....	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
6. HIPÓTESIS.....	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Sujetos y condiciones generales.....	24
Diseño experimental.....	24
Obtención de las camadas.....	24
Determinación de propensión al sobrepeso en crías grandes vs. pequeñas.....	25
Obtención de cerebros.....	25
Técnica de Inmunohistoquímica.....	26
Análisis del tejido.....	27
Análisis estadístico.....	27

8. RESULTADOS	28
Peso corporal.....	28
Expresión de NPY.....	33
Expresión de α -MSH.....	35
Células productoras de MCH.....	37
Células productoras de Orexina.....	41
9. DISCUSIÓN	44
Peso corporal.....	44
Cambios en péptidos asociados al peso corporal.....	44
Propensión a la obesidad y MCH.....	48
10. CONCLUSIONES	51
11. REFERENCIAS	52

ABREVIATURAS

AgRP: *Agouti Related Protein*, Proteína Relacionada a Agouti

ARNm: Ácido Ribonucléico mensajero

ARC: Núcleo Arqueado del Hipotálamo

α -MSH: *alpha-Melanocyte Stimulating Hormone*, Hormona Estimuladora del Melanocito alfa

CART: *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript*, Transcrito Regulado por Cocaína y Anfetamina

GABA: *Gamma Amino Butiric Acid*, Ácido Gamma Amino-Butírico

HDM: Hipotálamo Dorsomedial; Área dorsomedial del hipotálamo.

HL: Área Lateral del Hipotálamo; Hipotálamo Lateral

MC3R: *Melanocortin Receptor type 3*, Receptor a Melanocortinas tipo 3

MC4R: *Melanocortin Receptor type 4*, Receptor a Melanocortinas tipo 4

MCH1R: *Melanin Concentrating Hormone Receptor type 1*, Receptor a Hormona Concentradora de Melanina tipo 1

MCH: *Melanin Concentrating Hormone*, Hormona Concentradora de Melanina

NDM: Núcleo Dorsomedial del Hipotálamo

NPV: Núcleo Paraventricular del Hipotálamo

NPY: Neuropeptido Y

NSO: Núcleo Supraóptico

NSQ: Núcleo Supraquiasmático

NTS: Núcleo del Tracto Solitario

NVM: Núcleo Ventromedial del Hipotálamo

OID: Obesidad Inducida por Dieta

OX-A: Orexina A

PeF: Área Perifornical del Hipotálamo

POMC: *Pro-OPIO-MelanoCortin*, Pro-OPIOMelanoCortina

RESUMEN

En los últimos 20 años, la incidencia de obesidad en la población mundial se ha incrementado al grado que se ha convertido en un problema de salud pública, al estar asociada a enfermedades cardiovasculares y metabólicas, y en general, a una mala calidad de vida. La propensión a la obesidad ha sido estudiada experimentalmente, y en ratas se ha encontrado que existen individuos propensos a la obesidad (inducida por dieta) e individuos resistentes. El origen de esta diferencia no ha sido establecido aún. En el laboratorio se ha observado que al nacer, ratas de una misma camada difieren en su peso corporal, y esta diferencia se mantiene en edades posteriores. En este estudio proponemos que las crías que nacen con mayor peso también serán las que tengan mayor propensión a la obesidad, mientras que aquellas de bajo peso corresponderán al grupo resistente. Para averiguar si dicha diferencia en el peso corporal tendría una relación con diferencias en núcleos hipotalámicos reguladores de la conducta alimenticia, se identificaron en camadas de rata aquellas crías de alto y bajo peso. Se seleccionaron aquellas ratas que conservaron diferencias en el peso corporal de $\geq 10\%$ y se sacrificaron al día 30 de edad. Se extrajeron los cerebros, se cortaron, y se sometieron a inmunohistoquímica para NPY, α -MSH, MCH y Orexina A. Las tinciones fueron analizadas por densidad óptica y por conteo celular. En los sujetos con alto peso se encontró una población celular MCH mayor en el área dorsomedial hipotalámica,. Dicha zona está relacionada con la regulación del sistema nervioso autónomo y del gasto energético. Los resultados sugieren que estas diferencias en dicha población celular podrían estar relacionadas con un gasto energético disminuido en los sujetos con alto peso al nacimiento.

Para la elaboración de esta tesis se contó con apoyo del proyecto IN-203907 de PAPIIT-DGAPA UNAM. Además se recibió una beca de licenciatura del proyecto CONACYT 43950-M

INTRODUCCIÓN

La vida moderna caracterizada por el estilo de vida Norteamericano promueve la ingestión de alimentos, industrializados, de fácil preparación, altos en hidratos de carbono y grasas; y pobres en fibras y nutrientes esenciales. Aunado a esta dieta moderna, el estilo de vida excluye el ejercicio físico de los patrones diarios de actividad, sustituyendo a la actividad física con medios fáciles de transporte y promoviendo recreaciones frente a la pantalla de televisión o del cine. En consecuencia, en los últimos 20 años ha incrementado y sigue en aumento la incidencia de obesidad en la población mundial, al grado que se ha convertido en un problema de salud pública ya que a ella se asocia una mala calidad de vida, junto con enfermedades cardiovasculares y metabólicas.

Variabilidad en el desarrollo de obesidad

Con la finalidad de comprender los mecanismos asociados a esta epidemia de obesidad diversos estudios han abordado en roedores el problema del sobrepeso y la obesidad, evaluando factores asociados a la propensión al incremento de peso inducido por dietas altas en grasa o hidratos de carbono. Se ha reportado que la propensión a subir de peso ante el reto de estas dietas depende de variaciones individuales que podrían estar relacionadas con las características genéticas de los individuos en parte asociadas a las distintas cepas de rata, ya que las cepas más pesadas son también las más propensas a la acumulación de grasa corporal. (Rothwell, Saville, Stock, 1982). Otros estudios experimentales han observado que aún en ratas de la misma cepa existen diferencias en la propensión a la obesidad inducida por dieta; por ejemplo, en la cepa Sprague-Dawley, algunos sujetos se vuelven obesos al recibir una dieta alta en grasas, mientras otros permanecen delgados. Usando este abordaje, se reporta que en 2 a 3 meses el 50% de los roedores han aumentado de peso significativamente y rebasan el peso de los controles por más del 20%. Sin embargo, el otro 50% de los roedores, no desarrollan obesidad y se les conoce como “resistentes” a la obesidad (Levine, Dunn-Meynell, Balkan, Keeseey, 1997).

La variabilidad entre individuos para desarrollar obesidad ha planteado la pregunta sobre los mecanismos que propician la “resistencia” y se ha dirigido la atención a comprender los mecanismos cerebrales que pudieran propiciar la pérdida de homeostasis. En especial se ha dirigido la atención hacia los mecanismos del hipotálamo, que es la estructura cerebral involucrada en mantener la homeostasis energética del organismo.

Relevancia del hipotálamo para mantener el peso corporal

La propuesta de que la obesidad se puede asociar a cambios en el sistema nervioso y en particular en el hipotálamo, surge desde hallazgos de 1940 en que A. W. Hetherington y S.W. Ranson descubrieron que las lesiones bilaterales del hipotálamo de la rata tenían efectos sobre su conducta alimenticia. Las lesiones en el hipotálamo lateral tenían un efecto anoréctico, mientras que las lesiones en el hipotálamo ventromedial producían una sobreingestión. A partir de esto se pensó que el hipotálamo lateral era el centro del “hambre” y el hipotálamo ventromedial el de la “saciedad” (Bear, Connors, Paradiso, 2001) Muchos años de investigación después, se ha concluido de que la conducta de ingestión de alimento no se da de manera tan sencilla, y que los sistemas cerebrales involucrados son diversos y se encuentran relacionados a una complicada red de interconexiones.

La observación de que los animales que son sometidos a dietas muy altas o muy bajas en valor calórico regulan su alimentación reduciendo o incrementando su ingestión hasta que sus niveles de grasa vuelven a ser normales; llevó a pensar que en el cerebro existe un mecanismo de monitoreo de los niveles de grasa corporal, que actúa para mantener una homeostasis energética. G. Kennedy propuso en 1953 la “hipótesis lipostática” que sugería alguna clase de comunicación entre el tejido graso y el cerebro, específicamente de tipo hormonal (Bear, Connors, Paradiso, 2001). En 1960, D. Coleman, trabajando con ratones *ob/ob*, un tipo de ratón mutante que no posee un gen llamado *ob*; y que tiende a ser obeso; propuso que el gen faltante codificaba para la hormona que serviría de señal del estado de las reservas de energía. En un experimento, unieron quirúrgicamente dos animales, un ratón normal y un ratón *ob/ob*, y observaron que la sobreingestión de alimento (hiperfagia) y la obesidad del ratón mutante se reducían en gran medida por influ-

encia del ratón normal. Esto fue interpretado como que por medio de la unión con el ratón normal la señal hormonal que faltaba en el mutante había sido restablecida (Bear, Connors, Paradiso, 2001).

J Friedman, en 1994, aisló la proteína que se codificaba con el gen *ob/ob*. El tratamiento con dicha proteína revertía la obesidad y la hiperfagia en el ratón *ob/ob*, y se le llamó leptina (Halaas, Gajiwala, Maffei, Cohen, Chait, et al, 1995). Era la hormona que se proponía comunicaba al cerebro el estado de las reservas de energía del cuerpo (Bear, Connors, Paradiso, 2001). Desde este descubrimiento, gran parte de la investigación sobre metabolismo se ha dedicado a comprender la interacción de la leptina con los núcleos hipotalámicos involucrados con la ingestión de alimento y el equilibrio energético como sistema regulador del peso corporal.

El hipotálamo

El hipotálamo está situado en la base del cerebro, y se encarga de modular muchas funciones vitales, como los ritmos biológicos, la homeostasis de agua y sodio en el cuerpo necesarias para un funcionamiento óptimo, la temperatura corporal, la conducta de alimentación, y el funcionamiento del sistema nervioso autónomo. El hipotálamo es el centro integrador superior de las respuestas autónomas, endocrinas y conductuales que se dirigen a mantener un medio interno constante (Levine, 2000).

El hipotálamo está organizado en núcleos celulares. Para su descripción se divide parasagitalmente en las áreas medial y lateral. En el área medial, la parte más anterior, la porción supraóptica, contiene los núcleos supraquiasmático (NSQ), y paraventricular (NPV); la porción tuberal, posterior a la supraóptica, contiene los núcleos dorsomedial (NDM), ventromedial (NVM), y arqueado (ARC), incluyendo la eminencia media. La porción más posterior es la porción mamilar, que contiene al núcleo posterior. En el área lateral (LH), en un sentido rostrocaudal se localizan, el núcleo supraóptico (NSO), el núcleo lateral, el núcleo tuberal lateral y el núcleo tuberomamilar (Waxman, 2004; ver Figura 1)

Figura 1

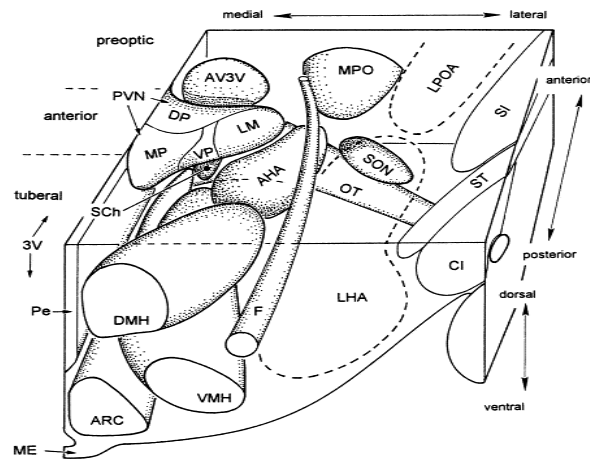


Figura 1. Esquema tridimensional del hipotálamo del hemisferio derecho de la rata. Abreviaciones: AHA, área hipotalámica anterior; ARC, núcleo arqueado; AV3V, área anteroventral del tercer ventrículo; CI, cápsula interna; DP, núcleo paraventricular, región parvocelular dorsal; DMH, núcleo dorsomedial; F, fórnix; LHA, área hipotalámica lateral; LM, núcleo paraventricular, región magnocelular lateral; LPOA, área lateral preóptica; ME, eminencia media; MP, núcleo paraventricular, región medial parvocelular medial; MPO, área preóptica medial; OT, tracto óptico; Sch, núcleo supraquiasmático; SON, núcleo supraóptico; SI, substancia inominata; ST, núcleo subtalámico; VMN, núcleo ventromedial; VP, núcleo paraventricular, región parvocelular ventral. Tomado de: Berthoud, H.-R., 2002.

Por debajo del hipotálamo medial se localiza la eminencia media que es el área circunventricular libre de barrera hematoencefálica, en la cual se sitúan los vasos del sistema portal que terminan en el lóbulo anterior de la glándula hipófisis. Por medio de este sistema las hormonas liberadoras y las hormonas inhibidoras de la liberación hormonal son transportadas desde el hipotálamo hasta las células secretoras, que a su vez liberan otras hormonas, o dejan de liberarlas (Snell, 2003). Es probable que además de ser un sitio de liberación de factores hipotalámicos, la eminencia media por la ausencia de barrera hematoencefálica sirva como acceso hacia el hipotálamo de insulina, leptina, y otras hormonas y sustratos metabólicos implicados en la ingestión de alimento y el consumo de energía (Havell, Larsen, Cameron, 2000).

El hipotálamo recibe muchas aferencias provenientes de las vísceras, la membrana mucosa olfatoria, y el cerebro en general. Algunas son las fibras aferentes lemniscales, el tracto solitario, y la formación reticular que transportan la sensación somática general, las sensaciones viscerales, y las sensaciones gustativas. El tracto retinohipotalámico lleva información visual al NSQ. Otros tractos transmiten información de los hemisferios cerebrales y de núcleos del sistema límbico.

Del hipotálamo surgen numerosas eferencias; dentro de las principales se encuentran: el tracto hipotálamohipofisiario, que va desde los núcleos NSO y NPV hasta la neurohipófisis para control hormonal. Del NPV se proyectan fibras hacia las células preganglionares del sistema autónomo en el tallo cerebral inferior y en la médula espinal para el control visceral (Buijs, Chun, Nijima, Romijn, Naga, 2001). Otras vías comunican al hipotálamo con el sistema límbico (Berthoud, 2007).

El hipotálamo regula la homeostasis

El hipotálamo es el principal modulador del funcionamiento del sistema nervioso autónomo visceral. También interviene en la respuesta a cambios en la temperatura, mantiene la osmolaridad de la sangre, así como los niveles hormonales específicos en su circulación. Regula además la actividad de la hipófisis anterior, a través de la liberación de factores de liberación; y desempeña una función endocrina a través de la liberación de oxitocina y vasopresina al torrente sanguíneo por medio de la hipófisis posterior (Haines, 2006)

Una serie de núcleos hipotalámicos se han relacionado directamente con la regulación de la homeostasis energética y el peso corporal. Estos núcleos son el ARC, NDM, NPV, NVM y HL. En particular en los últimos años se ha enfocado la atención en el ARC y el LH por la existencia de grupos celulares involucrados en la recepción de leptina como señal metabólica de la periferia y por sus proyecciones de salida al resto del sistema nervioso.

El núcleo arqueado (ARC)

A partir del descubrimiento de la leptina, el núcleo ARC se convirtió en centro de atención para comprender los mecanismos que regulan el balance energético y el peso corporal. La razón es porque se encuentra por encima de la eminencia media y por lo tanto tiene acceso a señales que ingresan de la periferia sin la intervención de la barrera hematoencefálica. Además el ARC es una de las estructuras cerebrales con mayor concentración de receptores a leptina (Schwartz, Seeley, Campfield, Burn, Baskin, 1996).

En el núcleo arqueado del hipotálamo se localizan dos subpoblaciones de células, adyacentes pero distintas (Hahn, Breininger, Baskin, Schwartz, 1998), las células productoras de NPY (neuropéptido Y), que se concentran principalmente en el ARC medial, y las células productoras de Pro-Opio-Melanocortina (POMC) que es el precursor de las Hormonas Estimuladoras del Melanocito (MSH's), localizadas en la zona lateral del ARC. Ambos grupos celulares envían proyecciones hacia diversas regiones en el hipotálamo, en particular a regiones del NPV y del HL (Yaswen, Diehl, Brennan, Hochgeschwender, 1999; Coll, 2007).

De las melanocortinas, el α -MSH se ha propuesto como la melanocortina con el papel más importante en la regulación del equilibrio energético (Coll, 2007). Las células productoras de este péptido también producen otro factor conocido como CART, que sus siglas significan transcrito del receptor a cocaína y anfetamina. Las neuronas productoras de NPY también producen otra molécula, AgRP, que es un antagonista de los receptores a melanocortinas (Ollmann, Wilson, Yang, Kerns, Chen, et al, 1997, Yang, Thompson, Dickinson, Wilken, Barsh, et al, 1999). Ambos tipos de células expresan el receptor a leptina (Håkansson, Brown, Ghilardi, Skoda, Meister, 1998; Cheung, Clifton, Steiner, 1997), la leptina estimula la actividad de las células productoras de ProOpioMelanocortinas (Cowley, Smart, Rubinstein, Cerdán, Diano, et al, 2001), mientras que inhibe la actividad de las células productoras de NPY (van den Top, Lee, Whyment, Blanks, Spanswick, 2004).

Función del α -MSH

El péptido α -MSH se ha caracterizado como una POMC, de naturaleza anorexigénica, esto es que genera sensación de saciedad y por lo tanto inhibe la ingestión de alimento. Por ejemplo, administrada intracerebroventricularmente causó una reducción en la ingestión de alimento en ratas (Ludwig, Mountjoy, Tatro, Gillette, Frederich, et al, 1998).

En ratas con restricción de alimento a dos horas al día, se presenta expresión de c-Fos (un marcador de actividad neuronal) en el ARC, específicamente en neuronas α -MSH, después del fin del acceso al alimento (Olszewski, Wirth, Shaw, Grace, Bilingtone, et al, 2001). Usando ratones *ob/ob*, se ha encontrado que en comparación con ratones normales, en los deficientes en leptina se presenta una frecuencia de corrientes postsinápticas inhibitorias mayor que en los ratones normales; así, en los ratones *ob*, existe un tono inhibitorio incrementado sobre las células POMC, lo cual explicaría su hiperfagia y obesidad. En estas células también se presenta un número de sinapsis reducido (menos de la mitad que en los ratones normales), y estas sinapsis son en su mayoría inhibitorias, al contrario de lo que sucede en los ratones normales. El tratamiento con leptina incrementa tanto el número total de sinapsis como el de sinapsis excitatorias, y decrementa la frecuencia de las corrientes postsinápticas inhibitorias (Pinto, Roseberry, Liu, Diano, Shanabrough, et al, 2004).

En ratones mutantes a los que se les ha eliminado el gen codificador para las proopiomelanocortinas (*Pomc*^{-/-}) presentan una pigmentación amarillenta, obesidad, niveles periféricos de leptina incrementados, y una ingestión de alimento incrementada; con respecto a ratones normales. El tratamiento con un agonista de hormona estimuladora del melanocito (MSH) provoca la pérdida de peso corporal (Yaswen, Diehl, Brennan, Hochgeschwender, 1999). Por otro lado, ratones heterocigóticos (*Pomc*^{+/-}) muestran un metabolismo alterado; aunque alimentados con dieta estándar mantienen un peso similar al de los ratones normales, al ser alimentados con dieta alta en grasas estos ratones se vuelven significativamente hiperfágicos y desarrollan obesidad (Challis, Coll, Yeo, Pinnock, Dickson, et al, 2004).

El papel de los receptores a melanocortinas es fundamental. en el cerebro, los receptores Mc3R y Mc4R se expresan en el hipotálamo (Coll, 2007; Mountjoy, Mortrud, Low, Simerly, Cone, 1994), en zonas involucradas con el equilibrio energético entre ellas la región parvocelular del núcleo NPV y el NDM. Los ratones Mc4R^{-/-} desarrollan un síndrome de obesidad que es acompañada de hiperfagia (Huszar, Lynch, Fairchild-Huntress, Dunmore, Fang, et al, 1997) y la obesidad de estos ratones mutantes parece deberse a su hiperfagia así como a una regulación del gasto energético alterada debida a hipoactividad, un consumo de oxígeno disminuido, y ausencia de activación simpática ante leptina (Ste.Marie, Miura, Marsh, Yagaloff, Palmiter, 2000). La deficiencia en el receptor Mc3R en el ratón, por su parte, lleva a un fenotipo que, aunque no difiere en el peso corporal del ratón normal, presenta un aumento en el tejido graso y una disminución en el tejido magro (Chen, Marsh, Trumbauer, Frazier, Guan, et al, 2000). La administración de un agonista de los receptores Mc3R y Mc4R reduce los efectos orexigénicos y adipogénicos de NPY (Raposinho, White, Aubert, 2003).

Función del NPY

Experimentalmente el NPY y el AgRP se han relacionado a la ingestión de alimento, como agentes orexigénicos, esto es que inducen a ingerir alimento y por lo tanto producen sensaciones de hambre. La inyección crónica de NPY en el NPV, provoca incremento en la ingestión de alimento, acumulación de grasa corporal incrementada y en consecuencia aumento de peso (Stanley, Kyrkouli, Lampert, Leibowitz, 1986). La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo (Maffei, Fei, Lee, Dani, Leroy, et al, 1995) que inhibe la actividad de las células productoras de NPY (van den Top, Lee, Whyment, Blanks, Spanwick, 2004), lo cual crea un asa de retroalimentación negativa, ya que a mayor grasa acumulada se produce más leptina y a través de la inhibición que ésta produce sobre las células de NPY se controla la ingestión de alimentos. La destrucción selectiva de las neuronas NPY/AgRP en ratones adultos tiene como consecuencia una reducción aguda de la ingestión de alimento (Gropp, Shanabrough, Borok, Xu, Janoschek, et al, 2005).

Al sistema de NPY/AgRP se le ha relacionado con la ingestión de alimento, debido a que inyectado intracerebroventricularmente en ratas incrementa la cantidad de alimento ingerido (Iida, Nakahara, Katayama, Murakami, Nakazato, 1999). Se ha observado que bajo la misma vía de administración, NPY incrementa la ingestión de una dieta alta en carbohidratos, cuando se presentan simultáneamente una dieta alta en carbohidratos y una dieta alta en grasas (Morley, Levine, Gosnell, Kneip, Grace, 1987).

La leptina ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de las células de NPY/AgRP. La rata Zucker es un tipo de rata cuyos receptores a leptina se encuentran atrofiados. Esta rata tiende a ser hiperfágica y obesa. Por medio de hibridación *in situ*, se determinaron los niveles de ARNm para NPY en ratas Zucker, a los 2, 5, 9, 12, y 25 días de edad. Desde la edad más temprana, se mostró un incremento en la expresión de ARNm para NPY en el núcleo arqueado (Kowalski, Houpt, Jahng, Okada, Liu, et al, 1999), indicando una sobreproducción de este péptido orexigénico. En estas mismas ratas Zucker juveniles (30 días de edad) se ha descrito una concentración de NPY en el ARC superior a la de sus contrapartes heterocigóticas, lo cual se ha asociado con su ingestión de alimento aumentada y, por consecuencia, con su fenotipo obeso (Beck, Burlet, Bazin, Nicolas, Burlet, 1993).

En los ratones *ob/ob*, un tipo de ratón carente de leptina, y que en consecuencia tiende a ser obeso, se encuentra que en las neuronas NPY/AgRP se presenta una frecuencia de corrientes postsinápticas excitatorias incrementada de lo cual se concluye que en estos ratones existe un tono excitatorio incrementado sobre las células NPY. En los mismos ratones también se observa un número incrementado de sinapsis en dichas células, y de éstas, el número de sinapsis excitatorias se encuentra incrementado, mientras que el de inhibitorias, disminuido; al contrario de lo que se observa en los ratones normales (Pinto, Roseberry, Liu, Diano, Shanabrough, et al, 2004).

La privación de alimento incrementa la expresión de NPY en el ARC (Lewis, Sheldard, Koeslag, Boer, McCarthy, et al, 1993; Park, Yi, Kim, Lee, Lee, et al, 2004), y produce un incremento en el potencial de acción de las neuronas NPY/AgRP en los ratones nor-

males, pero no en los ratones *ob/ob* o *db/db*, los cuales carecen de receptores para codificar la señalización central de leptina (Takahashi, Cone, 2005). También se ha observado un incremento en los niveles de ARNm para NPY en el núcleo ARC en ratones *ob/ob* o *db/db* con restricción alimenticia, en relación con sus pares sin restricción. De la misma manera, los niveles de expresión de los ratones mutantes fueron significativamente mayores que los de los ratones normales, bajo la condición de alimento *ad libitum* (Yamamoto, Ueta, Serino, Nomura, Shibuya, et al, 1999).

Existe una subpoblación de neuronas NPY/AgRP que también producen GABA, y se proyectan tanto al NPV como colateralmente a las neuronas POMC/CART (Horvat, Bechmann, Naftolin, Kalra, Leranthe, 1997) inhibiendo la actividad de estas últimas. La administración intracerebroventricular de α -MSH promueve una anorexia que es bloqueada por la administración de agonistas de GABA, mientras que la administración de un antagonista de GABA incrementa tal anorexia (Rao, Kokare, Sarkar, Khisti, Chopde, et al, 2003).

Hipotálamo Lateral (LH)

El hipotálamo lateral se ha considerado desde los años 50's como un área relevante para la regulación de la alimentación debido a que las lesiones de esta zona resultaban en anorexia. En esta área se localizan dos poblaciones celulares: las células productoras de MCH (Hormona concentradora de melanina) localizadas en el HL y en la zona subincertal del hipotálamo, y las células productoras de orexina, localizadas sólo en el HL (Date, Ueta, Yamashita, Yamaguchi, Matsukura, et al, 1999).

Función del MCH

Las primeras células de MCH aparecen al día 18 gestacional y a partir de esta fecha el número de células se incrementa, siguiendo un gradiente de medial a lateral, y alcanzan el número del adulto en el día 5 postnatal, el cual corresponde al 65% del total de células MCH. Así, el desarrollo del sistema MCH comienza en una época temprana, y la madura-

ción de este sistema continúa hasta los primeros días postnatales.(Brischoux, Fellmann, Risold, 2001)

La MCH se ha caracterizado como una hormona involucrada en la conducta alimenticia debido a que la administración intracerebroventricular de MCH produce un incremento en la ingestión de alimento de forma dosis dependiente (Rossi, Choi, O'Shea, Miyoshi, Ghatei, Bloom, 1997). Comparando ratones normales con ratones *ob/ob* (hiperfágicos) se observó que sin privación de alimento, los normales expresan niveles bajos de ARNm para MCH mientras que los *ob/ob* presentan niveles más altos. Este mismo patrón también se encontró en condiciones de privación de alimento (Qu, Ludwig, Gammeltoft, Piper, Pelleymounter, et al, 1996). De igual manera la inyección de 6nmol de MCH en el núcleo ARC del hipotálamo incrementa dramáticamente la ingestión de alimento en la primera hora posterior a la inyección, mientras que la ingestión acumulada, medida a lo largo de las 4 horas siguientes a la inyección, es significativamente mayor cuando el sitio de inyección es en el NPV, el NDM, o el ARC. La aplicación de MCH a explantes de hipotálamo basal promueve la liberación de NPY y de AgRP, y atenúa la liberación de α -MSH y de CART (Abbott, Kennedy, Wren, Rossi, Murphy, et al, 2003).

La supresión del gen para MCH en ratones produce un decremento en el peso corporal, un decremento en la ingestión de alimento y un gasto energético de reposo incrementado. Tales ratones pesan del 25 al 30% menos que sus contrapartes, esto debido a una reducción en la grasa corporal, niveles de leptina reducidos, y reducción en la expresión del gen POMC en el hipotálamo (Shimada, Tritos, Lowell, Flier Marathos-Flier, 1998).

En un estudio se creó una clase de ratón doble ko, que carecía tanto del gen *ob* (obesidad), como del gen para MCH (pérdida de peso). Los ratones doble ko presentaron un fenotipo obeso atenuado, en conjunto con una disminución en el tejido graso comparado con el ratón *ob* (Alon, Friedman, 2006). Su ingestión de alimento no difirió de la de los ratones *ob*; mientras que su actividad locomotora fue mucho mayor. El consumo de oxígeno también se presentó incrementado, incluso en reposo (Segal-Lieberman, Bradley, Kkkotou, Carlson, Trombly, et al, 2003). Por otro lado, en dos cepas de ratones, una relati-

vamente propensa a la obesidad inducida por dieta (OID) y otra relativamente resistente, en las cuales se eliminó el gen para MCH, los animales son relativamente delgados, y tal delgadez es resultado de un incremento en el gasto energético más que de hipofagia. Los ratones de la cepa resistente también presentan un incremento en la actividad locomotora. Al ser retados con dieta alta en grasa, ambos tipos de ratón carente de MCH permanecen delgados, al parecer como resultado de un incremento en la actividad locomotora y en la tasa metabólica. En los ratones de la cepa propensa a la obesidad, ésta no se presenta, mientras que en la cepa resistente, se observa un decremento en el peso corporal (Kokkotou, Jeon, Wang, Marino, Carlson, et al, 2005).

Se ha creado una clase de ratón en el cual se presenta una pérdida programada de células MCH; al llegar a la vida adulta estos ratones ya carecen de la gran mayoría de células y a esa edad presentan una reducción del 60% de la grasa corporal. Esta clase de ratón es más delgado, y muestra una ligera reducción en la ingestión de alimento junto con un incremento en el consumo de oxígeno (Alon, Friedman, 2006).

Por otro lado, la sobreexpresión a MCH lleva a una susceptibilidad incrementada a la obesidad. Ratones que sobreexpresan el MCH, al ser retados con una dieta alta en grasas, su propensión a la obesidad se encuentra incrementada con respecto a ratones normales con la misma dieta. Estos ratones también presentan hiperinsulinemia e hipertrofia de células beta en el páncreas (Ludwig, Tritos, Mastaitis, Kulkarni, Kokkotou, et al, 2001).

El receptor para MCH, MCH1R se expresa también en los núcleos ARC y ventromedial del hipotálamo lo que sugiere que este receptor puede mediar los efectos del MCH sobre el apetito (Hervieu, Cluderay, Harrison, Meakin, Maycox, et al, 2000). El ratón MCH1R ko presenta un peso corporal reducido respecto a los ratones normales, que parece explicarse por una disminución en aproximadamente un 50% del tejido graso. Su ingestión de alimento (dieta chow), sorprendentemente, es mayor que la de los ratones normales; esto debido a que invierte más tiempo en el consumo de alimento; sin embargo, al ser sometido a dieta alta en grasas la hiperfagia desaparece (en las hembras). También presenta un incremento en la actividad locomotora, incremento en la producción de calor,

y niveles reducidos de leptina, consistentes con el decremento en la masa grasa corporal (Chen, Hu, Hsu, Zhang, Bi, et al, 2002). La administración intracerebroventricular aguda de NPY, o de AgRP, evoca el mismo consumo de alimento en ratones MCH1R ko que en los ratones normales; mientras que la administración crónica de MCH no produce ningún efecto en dichos animales (MCH1R ko), aunque incrementa la ingestión de alimento y el peso corporal en los animales normales (Marsh, Weingarth, Novi, Chen, Trumbauer, et al, 2002).

Función de las Orexinas

El otro grupo celular localizado en el LH son las células de orexina. Existen dos tipos de orexina: orexina A y orexina B, y la familia es denominada así porque la administración intracerebroventricular de orexina en ratas, provocó un incremento en la ingestión de alimento (Sakurai, Amemiya, Ishii, Matsuzaki, Chemelli, et al, 1998). También la administración de orexina A en sitios específicos hipotalámicos (a los núcleos NPV y NDM, y las áreas PeF y HL) indujo un incremento en la ingestión de alimento en ratas (Dube, Kalra, Kalra, 1999). La privación de alimento por 48 horas lleva a un incremento significativo de los niveles de ARNm prepro-orexina en el HL en ratas (López, Seoane, García, Lago, Casanueva, et al, 2000; Mondal, Nakazato, Date, Murakami, Yanagisawa, et al, 1999). La administración aguda de insulina, lo cual lleva a un estado hipoglucémico, a las mismas ratas privadas de alimento, provocó un incremento en los niveles de ARNm prepro-orexina (Griffond, Risol, Jaquemard, Colard, Fellman, 1999), aunque no lo provocó en ratas alimentadas *ad libitum* a las que se les provocó la misma hipoglucemia (Cai, Widdowson, Harrold, Wilson, Buckingham, et al, 1999). Los niveles de expresión de mRNA de prepro-orexina de ratones *ob* y *db* son significativamente mayores que los de los ratones normales, bajo la condición de alimento *ad libitum* (Yamamoto, Ueta, Serino, Nomura, Shibuya, et al, 1999).

Para confirmar el papel de este sistema en la conducta alimenticia, se administró un antagonista del receptor a orexinas tipo 1, el cual provocó en ratones *ob/ob* una disminución en la ingestión total de alimento, una ganancia de peso menor que los tratados con

vehículo, y esto último se acompañó de un decremento en la masa corporal grasa y un gasto energético mayor. Se observó también la presencia de indicadores de actividad simpática incrementada en la grasa parda (Haynes, Chapman, Taylor, Moore, Cawthorne, et al, 2002).

También se han creado ratones carentes del gen para orexinas. Dichos ratones resultaron ser narcolépticos y su ingestión de alimento en la fase de oscuridad disminuyó significativamente. No obstante su reducción de alimento, desarrollaron obesidad de inicio tardío y al tratar de clarificar esto se encontró una actividad motora espontánea disminuida (Hara, Beuckmann, Nambu, Willie, Chamalli, et al, 2001).

Es posible observar la expresión del gen prepro-orexina desde el día postnatal 0 en el HL en ratas. Esta expresión se restringe exclusivamente a esa área. Le expresión es débil en el día 0 y se incrementa gradualmente hasta el día 15, de los días 15 a 20 la expresión se incrementa marcadamente y no existen cambios a edades posteriores. Por otro lado, la presencia de células inmunopositivas a orexina no se aprecia sino hasta el día 15 postnatal, dicha inmunoreactividad se incrementa entre los días 15 y 20 (Yamamoto, Ueta, Hara, Serino, Nomura, et al, 2000).

Circuitos hipotalámicos para regular el peso corporal

Las células del ARC, tanto de NPY/AgRP como de α -MSH envían proyecciones hacia ambos grupos celulares en el LH, y se encuentran botones sinápticos de dichas proyecciones en proximidad de dendritas de los mismos. La innervación se dirige densamente a la zona PeF, y en menor medida hacia el HL (Elias, Saper, Marathos-Flier, Tritos, Lee, et al, 1998). Específicamente, las células de orexina envían proyecciones recíprocas hacia el núcleo ARC, y hacen sinapsis con células de NPY, según se ha observado con microscopía electrónica (Horvath, Diano, van den Pol, 1999).

Se ha encontrado que el receptor para orexina de tipo 1 se expresa principalmente en el hipotálamo, más intensamente en el núcleo ventromedial, y moderadamente en el

área preóptica medial, los núcleos NDM y laterodorsal, el núcleo mamilar lateral, y el área posterior. También existe expresión del receptor en el núcleo ARC, donde interesante-mente el 46% de las neuronas productoras de NPY presentaron inmunoreactividad, así como el 38% de las células productoras de α -MSH (Suzuki, Shimojima, Funahashi, Saka-jo, Yamada, et al, 2002).

Bases fisiológicas de la propensión y resistencia a la obesidad

Algunos estudios han tratado de determinar los mecanismos que subyacen a la propensión o a la resistencia a la obesidad inducida por dietas altas en grasa o hidratos de carbono en roedores.

En principio, Las ratas propensas a la obesidad ingieren una cantidad de alimento mayor que las ratas resistentes, al ser retadas con dieta hipercalórica (Levin, Dunn-Meynell, Ricci, Cummings, 2003), a diferencia de las ratas resistentes, las cuales reducen la cantidad de alimento ingerido desde las primeras exposiciones a la dieta (Levin, Triscari, Hogan, Sullivan, 1987). Algunas respuestas autónomas en las ratas propensas a la obesidad son distintas de las de las ratas resistentes, como la secreción de norepinefrina, que se encuentra incrementada en las propensas (Levin, Dunn-Meynel, Banks, 2004). Estas mismas ratas propensas también muestran niveles más elevados de expresión de NPY en el núcleo ARC (Levin, Dunn-Meynell, 1997).

Las ratas resistentes, en un régimen de dieta hipercalórica, presentan niveles de leptina menores que las ratas propensas, y una expresión menor de ARNm para NPY y de ARNm para los receptores a NPY Y2 y Y5 en el ARC (Huang, Han, Storlien, 2003; Levin, Dunn-Meynell, 2002) Las obesas, por su parte, presentan niveles reducidos de ARNm para el receptor a leptina en el núcleo ARC, en el NVM, y en el NDM. Curiosamente, las ratas propensas presentan niveles de grelina (una hormona secretada por el estómago, de carácter orexigénico) circulante más bajos que las ratas resistentes, al igual que reducción del ARNm para el receptor a grelina en el núcleo ARC y el NDM (Levin, Dunn-Meynell, Ricci, Cummings, 2003).

En las ratas propensas, la administración de leptina no reduce la ingestión de alimento, al contrario de las resistentes (Levin, Dunn-Meynell, 2002). Las ratas propensas a la obesidad presentan una tasa de unión al receptor de leptina disminuida en relación con las ratas resistentes en el ARC, el NDM, y el NVM dorsal (Irani, Dunn-Meynell, Levin, 2006). La expresión de pSTAT3, un producto intracelular resultado de la activación del receptor a leptina, en el ARC, el NDM y el NVM, posterior a la administración de leptina es mayor en las ratas resistentes a la obesidad que en las propensas (Levin, Dunn-Meynell, Banks, 2004).

Las ratas propensas a la obesidad presentan una sensibilidad disminuida a los efectos anorécticos de la insulina (Clegg, Benoit, Reed, Woods, Dunn-Meynell, Levin, 2005) y la tasa de unión al receptor a insulina en el núcleo ARC también se encuentra disminuida en las ratas propensas (Irani, Dunn-Meynell, Levin, 2006).

La serotonina es un neurotransmisor que ha sido relacionado con la saciedad. Los ratones propensos a la obesidad presentan una densidad mayor del receptor a serotonina en el NVM, que los ratones resistentes, como resultado al parecer de niveles bajos de serotonina en el espacio sináptico (Huang, Huang, Han, Chen, Storlien, et al, 2004).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De todo lo anterior proponemos que diferencias morfométricas y anatómicas del hipotálamo también estén involucradas en la propensión a la obesidad. No queda duda que para mantener el balance energético y el equilibrio del peso corporal se requiere el buen funcionamiento de diversos grupos celulares, de los cuales algunos son orexigénicos y promueven el aumento de peso, mientras otros son anorexigénicos y promueven la pérdida del peso corporal. Así, se ha iniciado la búsqueda de diferencias en los grupos hipotalámicos relacionados con la conducta alimenticia y el equilibrio energético que puedan explicar la tendencia de algunos individuos a desarrollar obesidad.

En el Laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México se ha observado que en una misma camada de ratas Wistar, al nacimiento algunos individuos muestran pesos muy altos y otros muy bajos. Esta relación de tamaño y peso se mantiene hasta la vida adulta, sin llegar a ser una situación patológica. Basados en el conocimiento de que las ratas propensas a la obesidad presentaban un peso corporal mayor que las ratas resistentes, previo a la exposición a dieta alta en calorías (Levin, Triscari, Hogan, Sullivan, 1987), se planteó la posibilidad de que dicha diferencia en el peso corporal estuviese relacionada con diferencias en el hipotálamo, específicamente en los grupos celulares antes mencionados y que esta diferencia pudiera reflejar una propensión a la obesidad en las crías de mayor peso.

OBJETIVOS

1. Conocer las diferencias en poblaciones celulares del hipotálamo relacionadas con la ingestión de alimento, el equilibrio energético y el peso corporal, en ratas juveniles con alto y bajo peso corporal.
2. Determinar si el peso corporal al nacimiento puede reflejar una propensión a la obesidad.

HIPÓTESIS

1.

Hipótesis₀: Las poblaciones celulares del hipotálamo relacionadas con la conducta alimenticia y el equilibrio energético no son diferentes entre las crías nacidas de alto y bajo peso.

Hipótesis₁: Las poblaciones celulares del hipotálamo relacionadas con la conducta alimenticia y el equilibrio energético son diferentes entre las crías nacidas de alto y bajo peso.

2.

Hipótesis₀: Las crías nacidas con mayor peso tienen mayor propensión a la obesidad que las crías de bajo peso.

Hipótesis₁: Las crías nacidas con mayor peso tienen la misma propensión a la obesidad que las crías de bajo peso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sujetos y condiciones generales

Se utilizaron crías de camadas nacidas de ratas hembras Wistar. Durante todo el experimento las ratas se mantuvieron en cajas de acrílico transparente con cama de aserrín en un bioterio con condiciones reguladas de luz, a un ciclo 12: 12, temperatura estable y alimento y agua a disposición libre (*ad libitum*).

Diseño experimental

Se usó un diseño de estudio longitudinal, se establecieron dos grupos: crías de bajo peso vs. crías de mayor peso en las que se midió la evolución en el peso corporal de los primeros 30 días de vida, y la expresión de cuatro péptidos hipotalámicos.

En una segunda etapa se utilizó un diseño longitudinal para determinar si las crías de bajo y alto peso tienen diferente predisposición para desarrollar obesidad ante una dieta alta en grasas, para este grupo se realizaron mediciones de peso corporal.

Obtención de las camadas

Hembras vírgenes de 250 gr de peso se aparearon con machos adultos, para ello se alojaron hembras y machos en cajas colectivas en una proporción de un macho por cada 2 hembras. Después de una semana de apareamiento se retiraron los machos y durante las siguientes 3 semanas se hizo un seguimiento visual de las hembras para determinar posible embarazo. Unos días antes de cumplirse 3 semanas del inicio de apareamiento se alojó cada hembra individualmente en cajas de acrílico (47x 32x18 cm) con suficiente aserrín para elaborar un nido. El día de nacimiento de las crías fue considerado el día 0. Al día 1 de edad, las crías fueron separadas por sexo, se pesaron, se ordenaron por peso y clasificaron como grandes, pequeñas o intermedias. Las grandes pesaron entre 10 y 15% más que las chicas. De esta manera las camadas quedaron constituidas por al menos una pareja de crías clasificadas como chica y grande, más sujetos intermedios suficientes

para completar 8 individuos. Para lograr el seguimiento se marcaron las crías grandes y chicas por medio de la amputación de una uña de una pata anterior.

Las crías se pesaron cada 10 días hasta el día 30 en que se verificó si la clasificación inicial se había conservado. Aquellas crías que habían cambiado de categoría de peso en la camada fueron eliminadas (n=4).

Determinación de propensión al sobrepeso en crías grandes vs. pequeñas

Para corroborar si el peso corporal al nacimiento y a lo largo del desarrollo es efectivamente un factor que propicia el sobrepeso y la obesidad, se obtuvo una segunda serie de camadas y se procedió a su marcaje y seguimiento de peso de la forma antes mencionada. Al día 30 de edad se seleccionaron los sujetos que cumplían con los criterios de diferencia de peso y se alojaron por parejas de un sujeto pequeño y uno grande (de la misma camada) en cajas colectivas de 53x45x19.5 cm, y se pesaron a los días, 45, 60 75 y 90 de edad. El día 90 se separaron las parejas y los sujetos fueron alojados individualmente en cajas de acrílico grandes (47x 32x18 cm), y se pesaron nuevamente a los 120 días. Ese mismo día se inició la administración de 10g de dieta alta en grasas por día a cada individuo, y este régimen se mantuvo hasta el día 180 de edad, día en el que fueron sacrificadas. Una vez sacrificadas, se extrajeron los depósitos de grasa intestinal y retroperitoneal, y se pesaron.

Obtención de cerebros

El día 30 de edad se pesaron nuevamente las crías y se identificaron las grandes y las chicas. Éstas fueron anestesiadas con una dosis letal de pentobarbital, y, acto seguido, fueron perfundidas por punción intracardiaca con solución salina (0.9%) seguida de solución de paraformaldehído (4%) en buffer de fosfatos al 0.1 M y pH 7.2 (PB). se extrajeron los cerebros, se guardaron en viales, donde permanecieron postfijándose durante 7 días en solución de paraformaldehído(4%) en PB; después se mantuvieron en solución de sacarosa (30%) como crioprotector, hasta el momento de ser cortados.

Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 40 μm de espesor; las secciones se depositaron en pozos que contenían solución PB + 0.9% NaCl (PBS), organizadas en cuatro series y de anterior a posterior.

Técnica de Inmunohistoquímica

Para el procedimiento de inmunohistoquímica se seleccionaron las secciones que contenían al hipotálamo. Se extrajeron los cortes de las charolas y se depositaron en tinas en las que se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS; después del último lavado, los cortes fueron colocados en tubos Eppendorf para su incubación con anticuerpo, ya fuera para orexina (OX), MCH, NPY o α -MSH diluidos 1:1000 en solución PBS con Tritón X-100 al 0.3% y suero animal al 0.1% a 4°C por 48 horas. Pasado este tiempo, los cortes fueron depositados nuevamente en tinas y se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS. Después, los cortes se incubaron con anticuerpo biotinilado secundario 1:200, en solución PBS con Triton X-100 y suero animal, a temperatura ambiente por 2 horas. En seguida, los cortes se volvieron a lavar por 10 minutos con PBS, y después se incubaron con el complejo macromolecular Avidina y peroxidasa de rábano Biotinilada (ABC) en solución PBS con Triton X-100 y suero animal; por otras 2 horas a temperatura ambiente. Al finalizarse la última incubación, los cortes se depositaron en tinas y se les realizó una última serie de tres lavados de 10 minutos con PBS, para finalmente activar la reacción con el cromógeno Diaminobenzidina diluida en solución de Trizma®(pH 7.2) y 35 μl de peróxido de hidrógeno al 30%. Cuando se obtuvo un nivel de tinción suficiente, los cortes fueron sumergidos en PBS para detener la reacción. Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, cada portaobjetos se marcó con las características respectivas del sujeto. Los portaobjetos se deshidrataron en una serie de alcoholes y xilol y se cubrieron con cubreobjetos y medio de montaje para microscopía (Entellan) para su observación al microscopio.

Análisis del tejido

Los portaobjetos cubiertos se observaron con un microscopio de luz. En los cortes teñidos para NPY y para α -MSH se ubicó la zona del núcleo arqueado del hipotálamo y para el análisis se seleccionaron un corte anterior y uno posterior, correspondientes a las láminas 29 y 33 del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1998).

En los cortes teñidos para MCH se examinó la zona del hipotálamo dorsomedial, el área perifornical, y el área lateral del hipotálamo. En los cortes teñidos para OX se procedió de la misma manera, delimitando la tinción al núcleo dorsal medial, a las regiones perifornical y lateral del hipotálamo, y se seleccionaron un corte anterior, uno medio y uno posterior, que corresponden, respectivamente, a las láminas 29, 31 y 33 del atlas de Paxinos y Watson (1998). Posteriormente se tomaron fotografías de las regiones delimitadas con una cámara digital conectada al microscopio. Esas fotografías se analizaron con el programa Metavue, y se realizó el conteo de las células teñidas con un sistema de análisis de imágenes (Metavue, Nikkon).

Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias en el peso corporal entre los sujetos pequeños y grandes de ambas series a lo largo del tiempo se usó un análisis de varianza de medidas repetidas, y se realizó una prueba de Tukey como análisis *post hoc*. Para comparar las diferencias en las inmunohistoquímicas se utilizó una prueba *t* de Student en los casos en los que se consideró pertinente. Se consideró significativo un valor de α -de 0.05.

RESULTADOS

Peso corporal

Al día de nacimiento (día 0) se obtuvieron camadas con 7 a 12 individuos. En la primera serie, al día 1 y de acuerdo a nuestro criterio de clasificación para crías grandes y chicas, se obtuvieron 13 parejas, 11 parejas de machos y 3 de hembras (ver figura 2).



Figura 2. Pareja de crías en el día 1 de edad, compuesta por la cría más chica y la cría más grande de una misma camada. La diferencia de tamaño es evidente a simple vista, y se refleja en el peso corporal.

En los días subsiguientes (10, 20, y 30) la diferencia de peso de $\geq 10\%$ entre los sujetos marcados como grandes y pequeños se mantuvo en nueve parejas de machos y en una de hembras; en las parejas restantes (dos de machos y dos de hembras) la diferencia de peso se atenuó; estas parejas fueron excluidas del análisis. Para los análisis se consideraron aquellas parejas de crías que al día 30 de edad mantuvieron una diferencia \geq del

10%. La pareja restante de hembras que sí conservó la diferencia también fue excluida, por ser única.

Al día 1 el promedio de peso corporal de las crías chicas fue de 7.24 ± 0.30 gramos y el de las grandes de 8.53 ± 0.18 gramos. Al día 30 de edad, el promedio de peso corporal de las crías chicas fue de 86.31 ± 5.61 gramos y el de las grandes de 95.15 ± 4.03 gramos (ver figura 3 y tabla 1) El análisis de varianza para medidas repetidas indicó diferencias significativas entre los grupos ($f(1,52)=5.43$; $p<0.023$) así como a través del tiempo ($f(3,52)=408.06$; $p<0.0001$). Sin embargo la prueba *post hoc* no mostró diferencias entre los grupos para cada edad evaluada.

Tabla 1. Promedio de peso corporal de crías pequeñas ($n=7$) y grandes ($n=8$)

GRUPO	EDAD			
	DÍA 1	DÍA 10	DÍA 20	DÍA 30
Pequeños	7.24 ± 0.30	22.34 ± 1.10	42.33 ± 1.65	86.31 ± 5.61
Grandes	8.53 ± 0.18	24.78 ± 1.20	46.39 ± 0.97	95.15 ± 4.03

Peso corporal

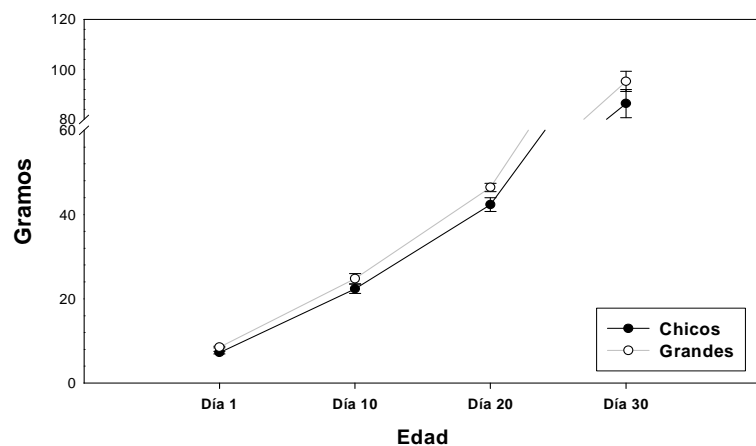


Figura 3. Evolución de los pesos corporales de las crías pequeñas (negro; $n=7$) y grandes (gris; $n=8$) del día 1 al día 30 de edad

Comparadas las crías pequeñas vs. las grandes la diferencia de peso corporal siempre fue mayor del 10% fluctuando entre 12 % y 17% (ver tabla 2).

Tabla 2. Proporción promedio \pm error estándar de 9 parejas, expresado en porcentaje de peso corporal, de un grupo respecto al otro.

COMPARACIÓN	EDAD			
	DÍA 1	DÍA 10	DÍA 20	DÍA 30
Grandes vs pequeños	120.5 \pm 3.9 %	112.9 \pm 3.8 %	113.5 \pm 3.0 %	117.8 \pm 2.01 %
Pequeños vs Grandes	83.6 \pm 2.5 %	89.3 \pm 3.0 %	88.5 \pm 2.3 %	85.0 \pm 1.4 %

En la segunda serie, al día 1 se obtuvieron 15 parejas, 9 de machos y 6 de hembras. En los días subsiguientes (10, 20, y 30) la diferencia de peso de $\geq 10\%$ entre los sujetos marcados como grandes y pequeños se mantuvo en seis parejas de machos y en tres de hembras; en las parejas restantes (tres de machos y tres de hembras) la diferencia de peso se atenuó; estas parejas fueron excluidas del análisis. También se excluyeron las parejas de hembras que sí conservaron el criterio. Para los análisis se consideraron las 6 parejas de crías macho que al día 30 de edad mantuvieron una diferencia \geq del 10%. Al día 1 el promedio de peso de los sujetos machos pequeños fue de 6.83 \pm 0.38 g, mientras que el de los sujetos grandes fue de 7.52 \pm 0.28 g. En el día 30 de edad, el promedio de peso corporal de las crías chicas fue de 85.13 \pm 4.82 gramos y el de las grandes de 100.55 \pm 6.30 gramos. En los días subsiguientes, la diferencia en el peso corporal $\geq 10\%$ se mantuvo hasta el día 120, en el que se inició la administración de dieta alta en grasas. La diferencia de peso entre grupos se acentuó hasta el día 180 de edad, día en el que los sujetos fueron sacrificados (Ver figura 4). El análisis de varianza para medidas repetidas, indicó diferencias significativas entre los grupos (F (1,90)=54.02; $p < 0.0001$) así como a través del tiempo (F (8,90)=103.23; $p < 0.0001$). La prueba post hoc mostró diferencias entre los grupos a la edad de 165 días.

Al igual que con la primera serie se determinó la proporción de peso corporal comparando las crías grandes vs. chicas y viceversa. A lo largo de la vida la diferencia fluctuó entre 10 y 18%. Cuando se dio la dieta alta en grasa, los grupos mantuvieron una diferencia de entre 16 – 18% indicando que el grupo de ratas pesadas tenía mayor propensión a aumentar de peso por dicha dieta (ver tabla 4).

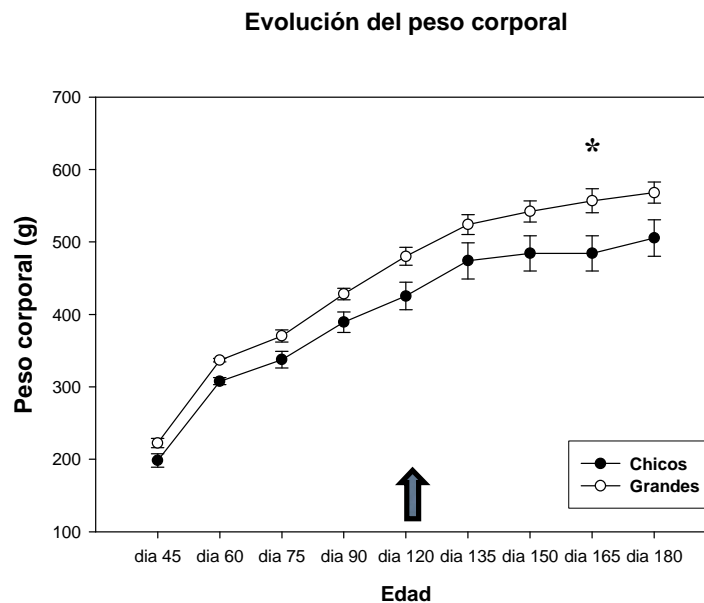


Figura 4. Evolución del peso corporal de las crías pequeñas (negro; $n=6$) y grandes (blanco; $n=6$) del día 45 al día 180 de edad. La flecha indica el inicio de la administración de dieta alta en grasas (día 120).

Tabla 4. Promedio de proporción \pm error estándar de 6 parejas, expresado en porcentaje de peso corporal, de un grupo respecto al otro.

EDAD													
Dieta regular Chow										Dieta alta en grasa			
COMPARACIÓN	DÍA 1	DÍA 10	DÍA 20	DÍA 30	DÍA 45	DÍA 60	DÍA 75	DÍA 90	DÍA 120	DÍA 135	DÍA 150	DÍA 165	DÍA 180
Grandes vs pequeños	110.6 \pm 2.4 %	120.6 \pm 10.9 %	115.0 \pm 7.5 %	118.2 \pm 4.3 %	118.8 \pm 6.7 %	111.6 \pm 2.4 %	110.6 \pm 1.5 %	110.8 \pm 3.0 %	112.9 \pm 2.4 %	114.7 \pm 3.7 %	118.0 \pm 4.4 %	118.0 \pm 4.2 %	116.3 \pm 4.4 %
Pequeños vs Grandes	90.7 \pm 2.0 %	85.4 \pm 5.9 %	88.4 \pm 4.8 %	85.1 \pm 2.7 %	85.2 \pm 4.1 %	89.9 \pm 1.8 %	90.5 \pm 1.2 %	90.5 \pm 2.4 %	88.7 \pm 1.8 %	87.6 \pm 2.7 %	85.3 \pm 3.1 %	85.2 \pm 2.9 %	86.6 \pm 3.1 %

Los depósitos de grasa abdominal (intestinal y retroperitoneal) se extrajeron y se pesaron. No se observaron diferencias entre los grupos (ver figura 5).

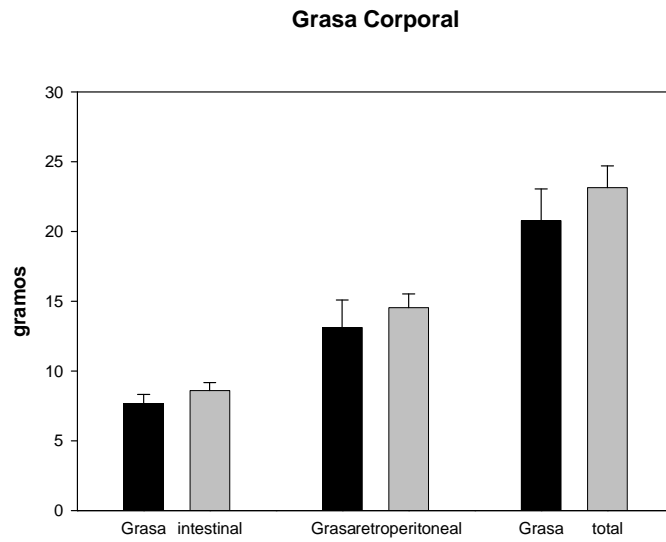
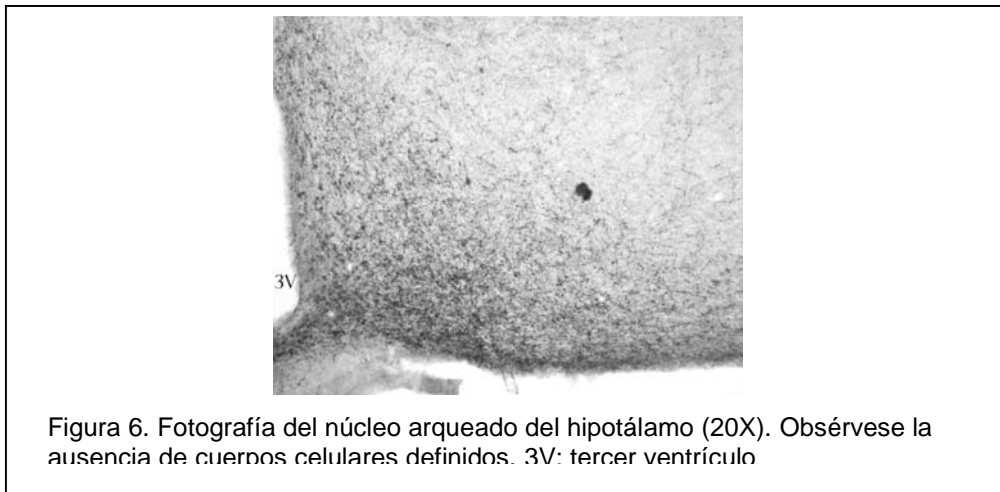


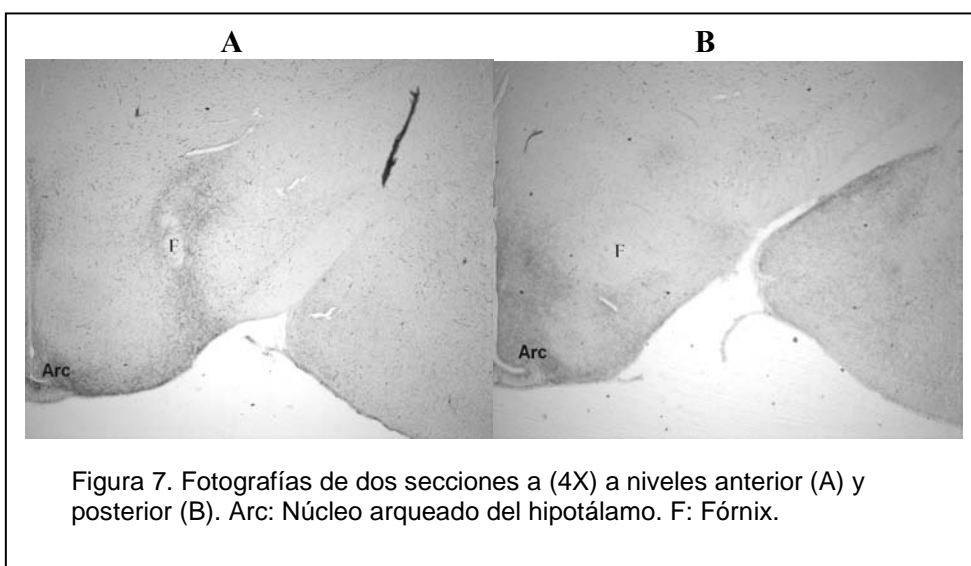
Figura 5 . peso de los depósitos de grasa de sujetos chicos (negro, $n=4$) y grandes (gris, $n=4$) en gramos. Grasa total indica la suma de ambos depósitos.

Expresión de NPY

Con la tinción de NPY, se observaron fibras y vesículas, pero no se observaron cuerpos celulares (ver Figura 6).



Al no poder evaluarse el número de células positivas a NPY por conteo celular, se procedió a evaluar la densidad óptica de la tinción, con el programa ImageJ. Se seleccionaron 2 cortes del núcleo ARC, uno anterior (Bregma-2.30) y uno posterior (Bregma-3.30) de acuerdo a las coordenadas de Paxinos y Watson (ver figura 7)



La densidad óptica se estimó en Unidades Arbitrarias (UA). En ninguno de los dos niveles, se observaron diferencias entre los cerebros de las crías grandes y las pequeñas (ver figura 8).

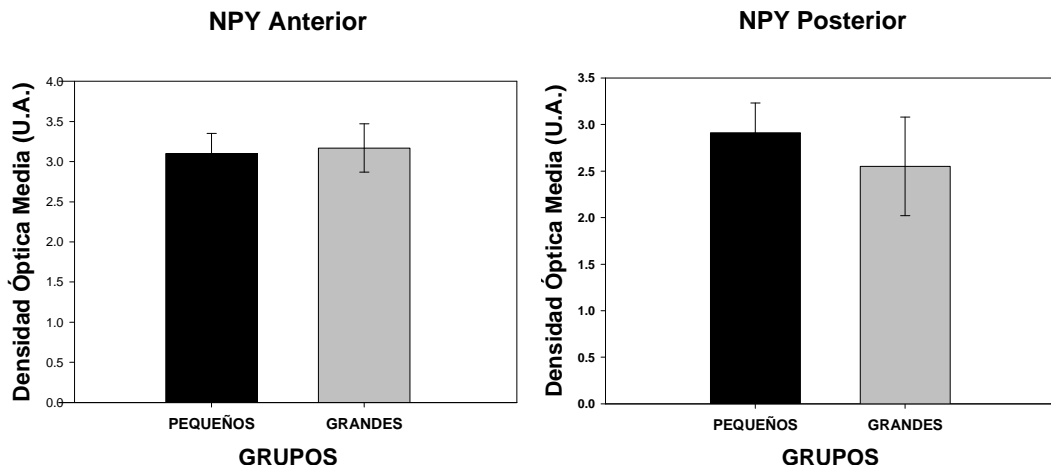
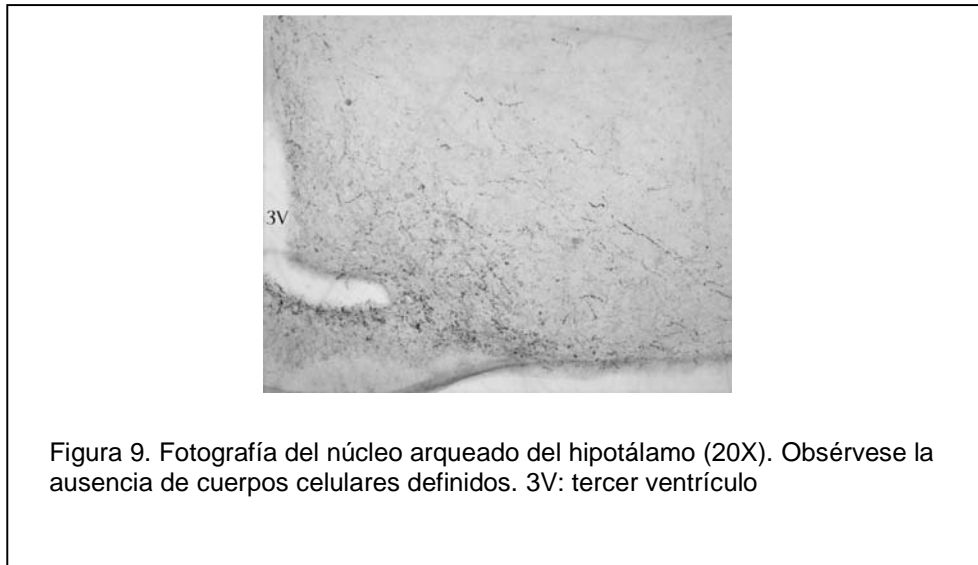


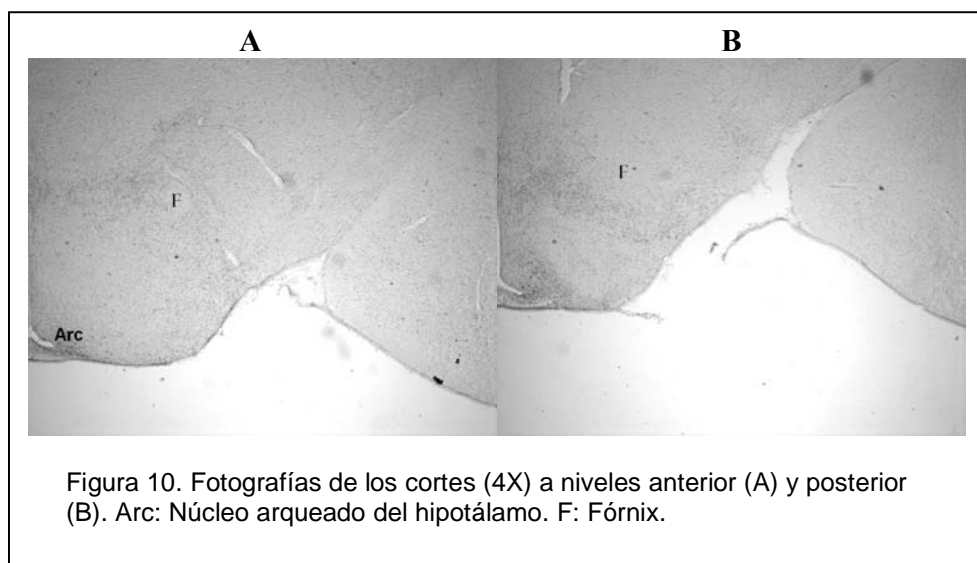
Figura 8: Promedio de densidad óptica de la expresión de NPY en el núcleo arqueado anterior y posterior de crías pequeñas (negro; $n=6$) y crías grandes (gris; $n=6$).

Expresión de α -MSH

Con la tinción de α -MSH, se observaron fibras y vesículas en el ARC, pero no se observaron cuerpos celulares (ver Figura 9).



Al no poder evaluarse con conteo celular, se procedió a evaluar la densidad óptica de la tinción, con el programa ImageJ. Se seleccionaron 2 cortes del núcleo ARC, uno anterior (Bregma -2.30) y uno posterior (Bregma -3.30) de acuerdo a las coordenadas de Paxinos y Watson (ver figura 10).



La densidad óptica se estimó en UA. En ninguno de los dos niveles se observaron diferencias entre el grupo de crías grandes y el de las crías pequeñas (ver figura 11).

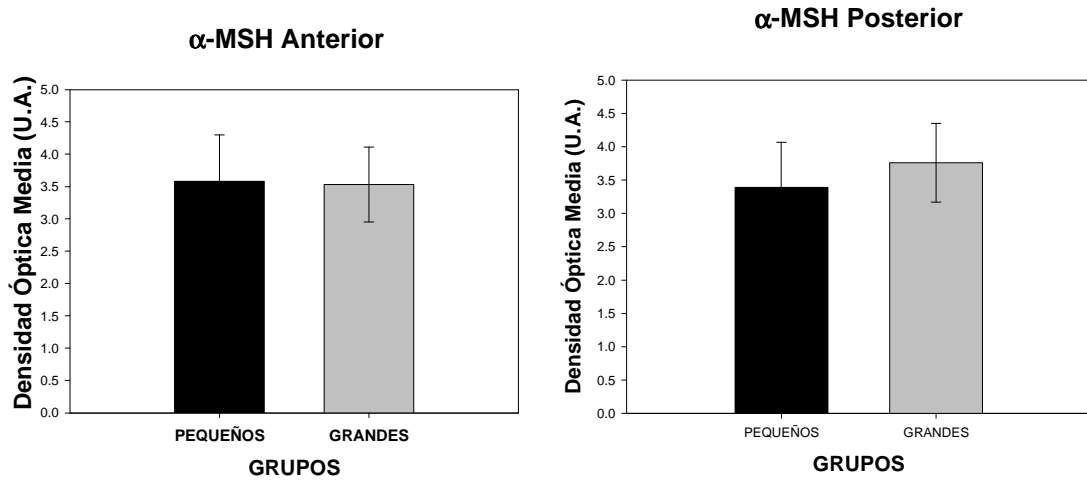
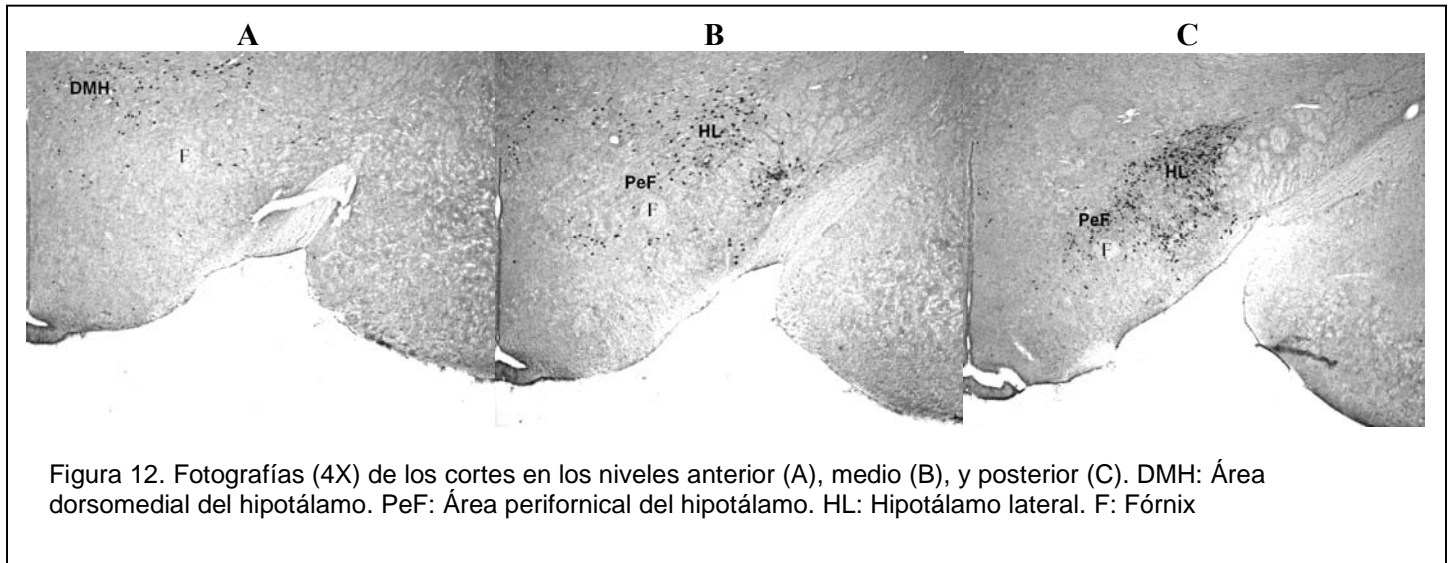


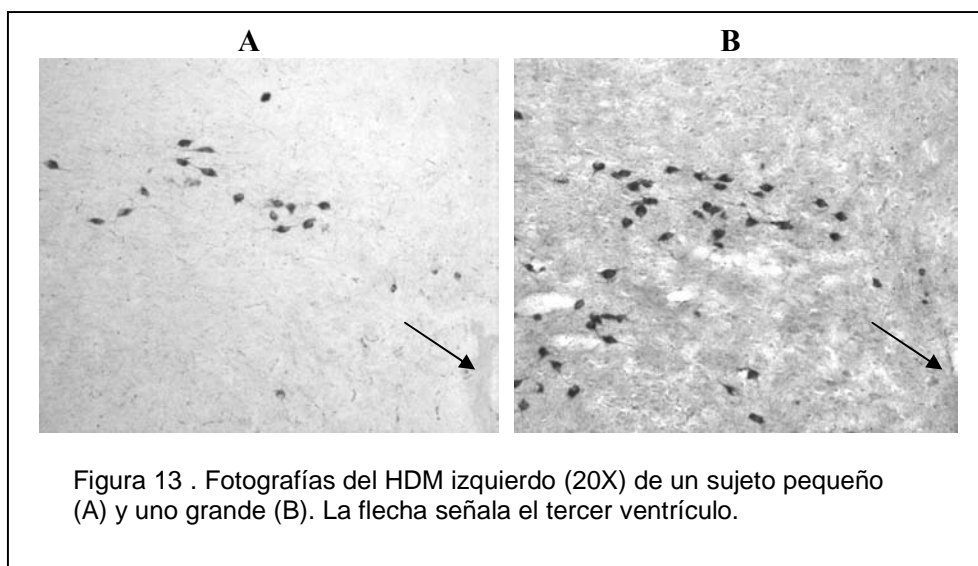
Figura 11. Promedio de densidad óptica de la expresión de α -MSH en el núcleo arqueado anterior y posterior de crías pequeñas (negro; $n=7$) y crías grandes (gris; $n= 8$).

Células productoras de MCH

La tinción para MCH se limitó a cuerpos celulares localizados en las áreas dorsomedial, perifornical y lateral del hipotálamo. En el área dorsomedial, dichos cuerpos se localizaron mayoritariamente en un nivel anterior (Bregma -2.30); mientras que en las áreas perifornical y lateral, la tinción se presentó mayoritariamente en los niveles medio y posterior (Bregma -2.80 y -3.30, respectivamente; ver figura 12).



En el HDM se observó una diferencia significativa en el número de células inmunoreactivas de MCH ($t = -2.5831$; $p < 0.0324$), caracterizada por mayor número en las crías grandes (ver figuras 13 y 14).



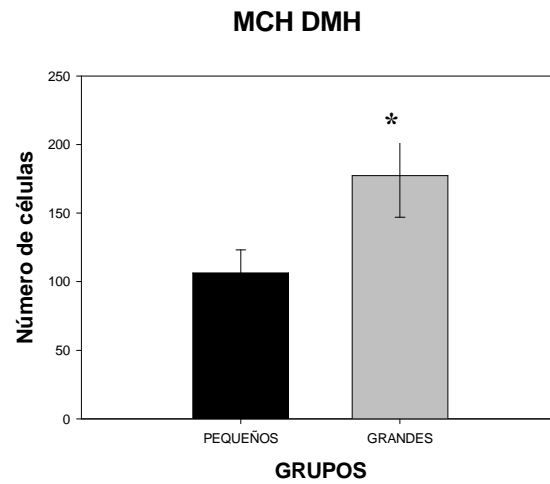


Figura 14. Promedio de número de células MCH de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=5$) en el hipotálamo dorsomedial.

En el área perifornical y en el hipotálamo lateral, no se observaron diferencias entre ambos grupos (ver figuras 15, 16, 17 y 18).

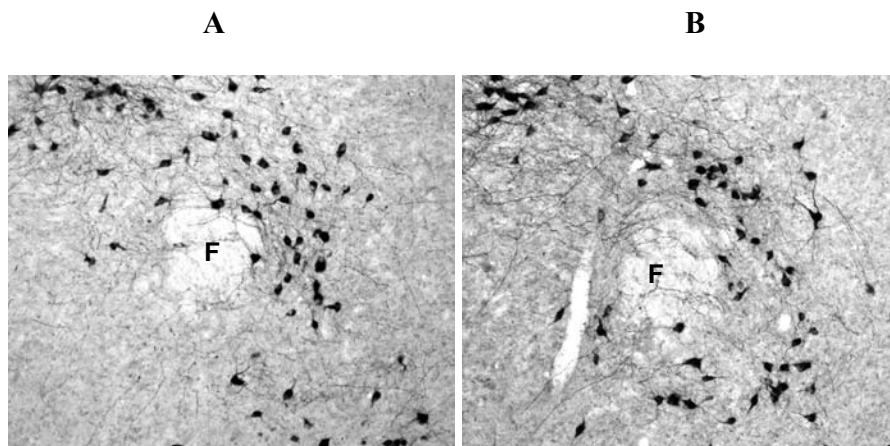


Figura 15 . Fotografías del PeF izquierdo (20X) de un sujeto pequeño (A) y uno grande (B). F: Fórnix.

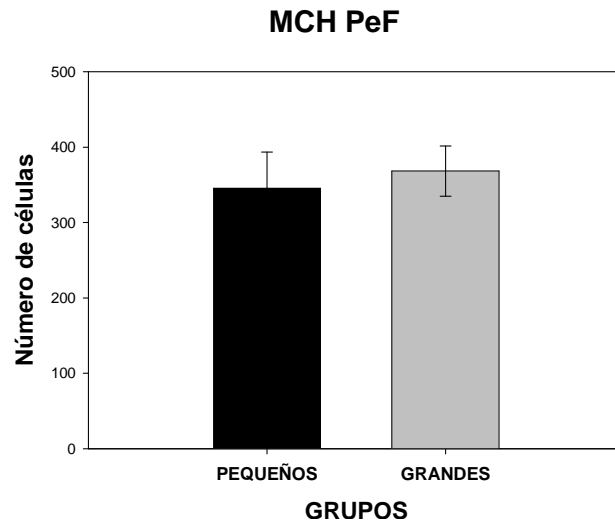
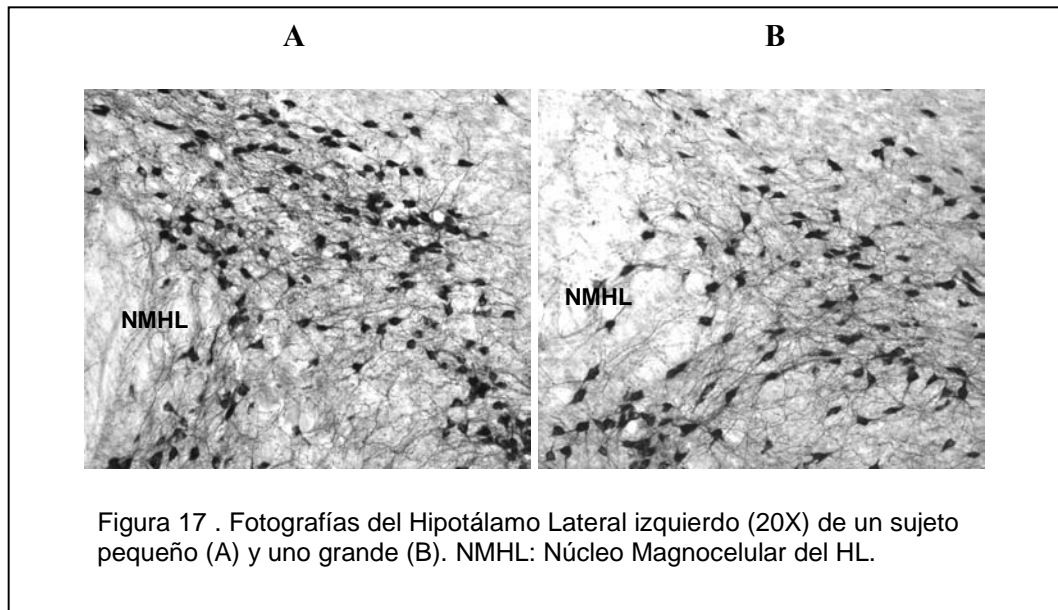


Figura 16. Promedio de número de células MCH de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=5$) en el área perifornical del hipotálamo.



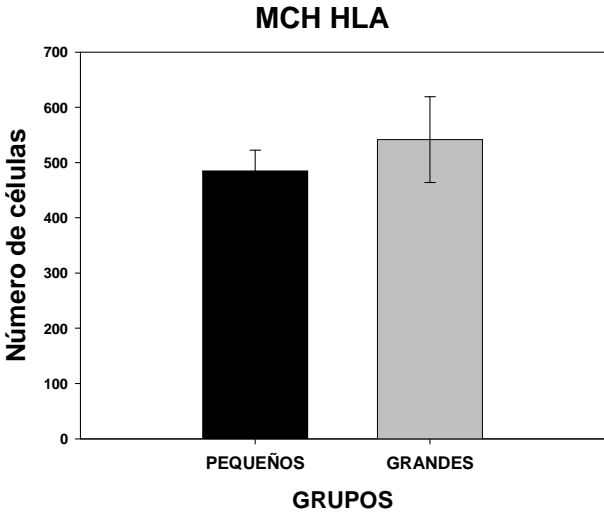


Figura 18. Promedio de número de células MCH de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=5$) en el hipotálamo lateral.

Sumando todas las áreas, para estimar si había alguna diferencia en el número total de células entre los grupos, no observaron diferencias entre ambos grupos (ver figura 19).

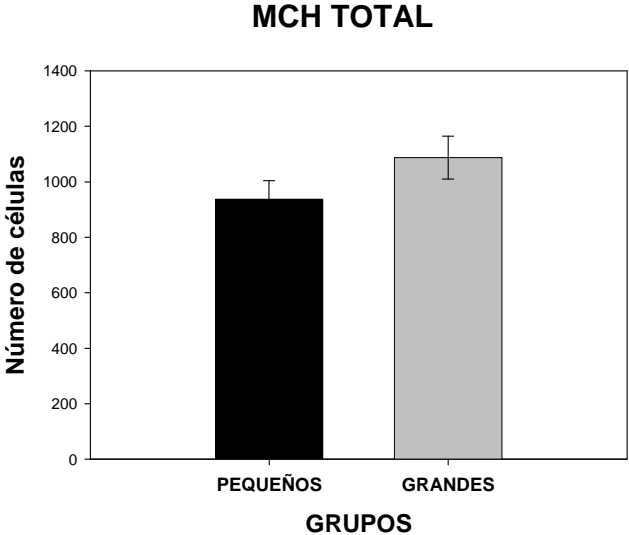
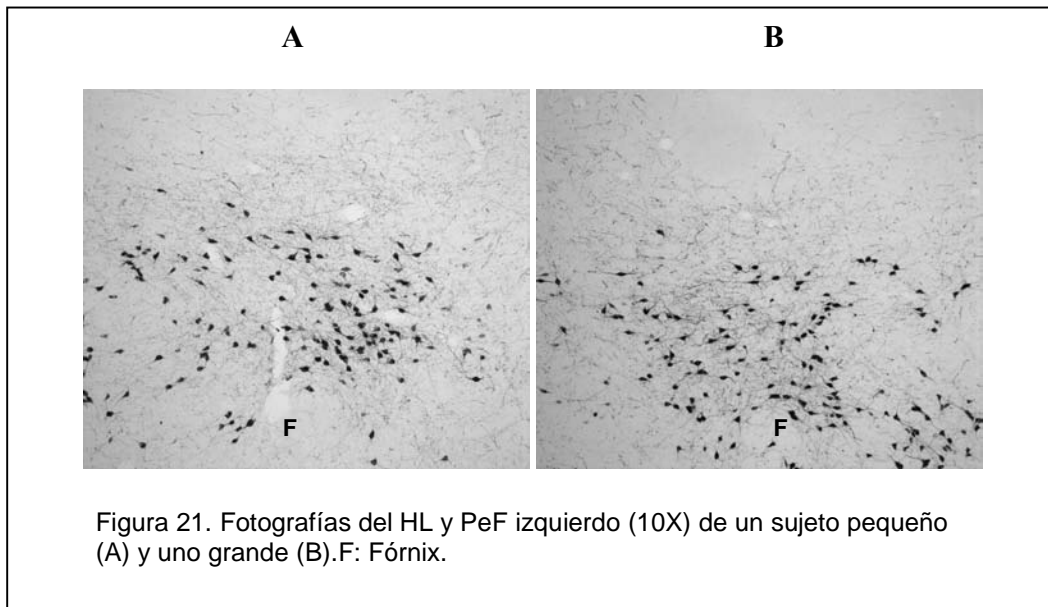
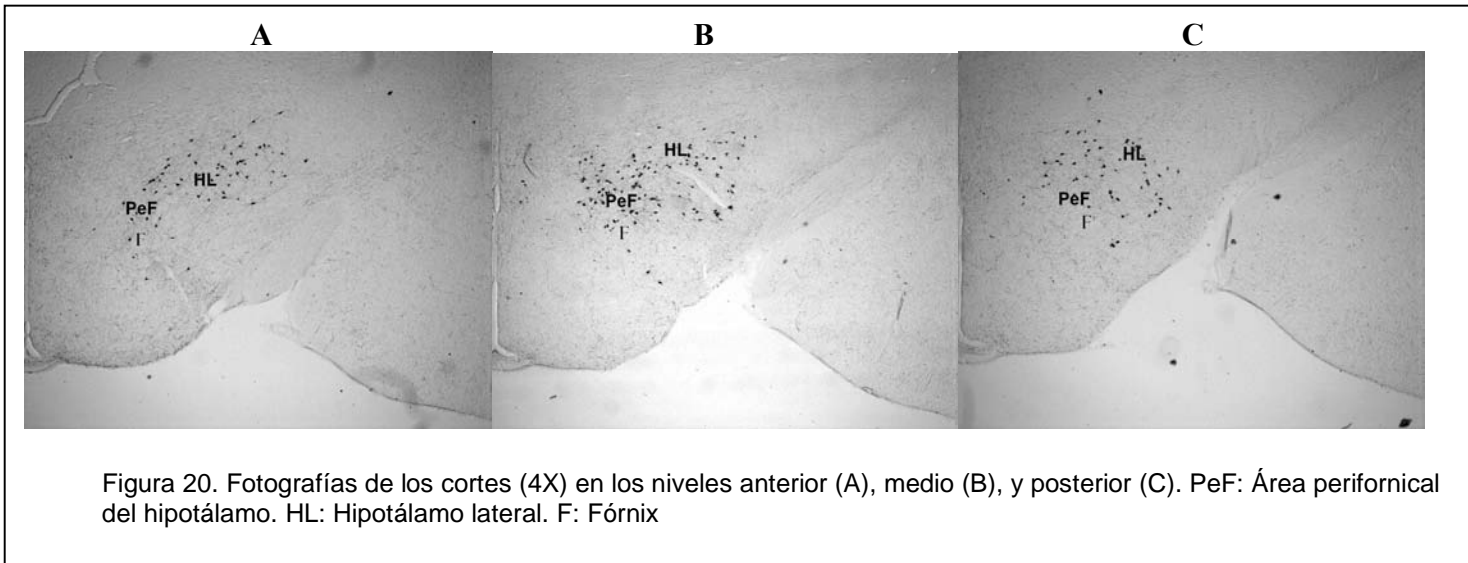


Figura 19. Promedio de número total de células MCH de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=5$).

Células productoras de Orexina

La tinción de orexina se limitó a cuerpos celulares bien definidos en las áreas perifornical y lateral del hipotálamo (ver figuras 20 y 21). Para evaluarla, se seleccionaron cortes a tres niveles: anterior (Bregma -2.30), medio (Bregma -2.80), y posterior (Bregma -3.60). Los cuerpos celulares de ambas áreas fueron sumados, considerándose como una población única.



En ninguno de los tres niveles se observaron diferencias entre ambos grupos (ver figuras 22, 23 y 24).

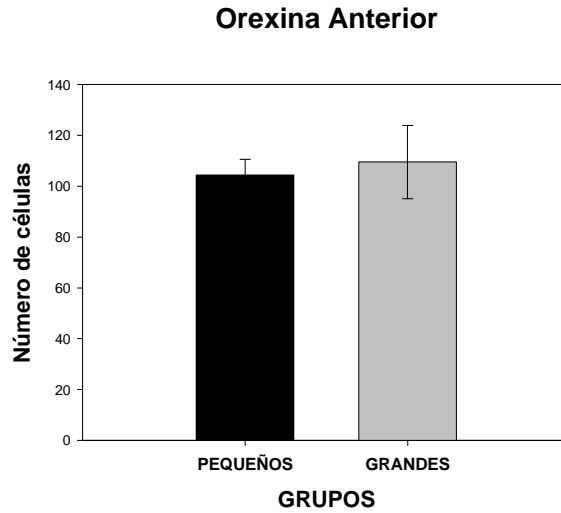


Figura 22. Promedio de número de células productoras de orexina de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=6$) en el nivel anterior.

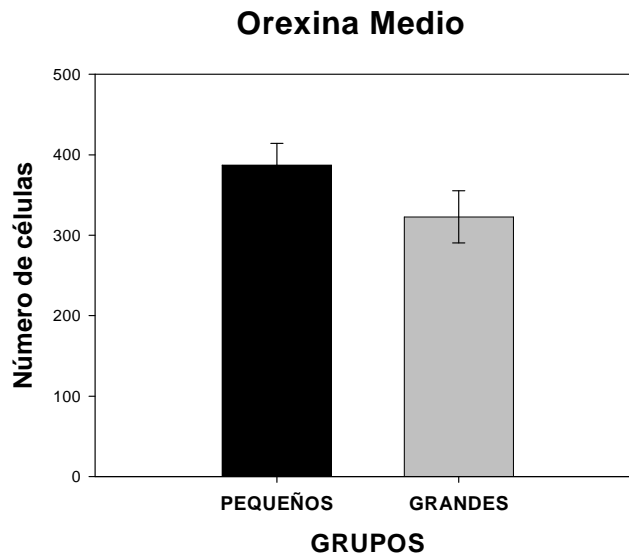


Figura 23. Promedio de número de células productoras de orexina de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=6$) en el nivel medio.

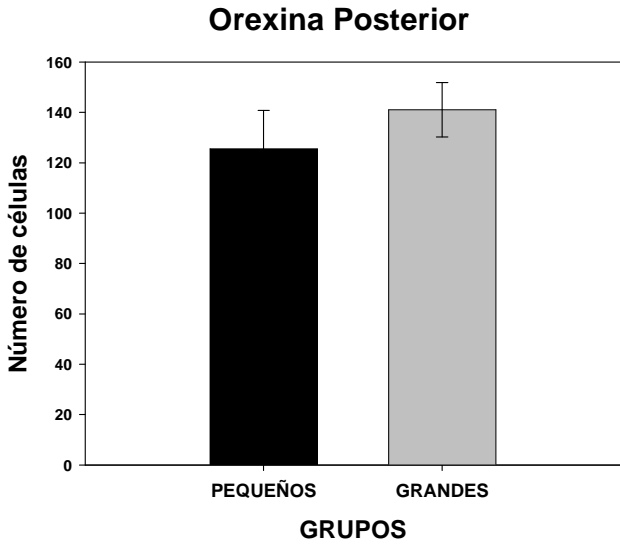


Figura 24. Promedio de número de células productoras de orexina de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=6$) en el nivel posterior.

Sumando los tres niveles, para establecer un número total de células, tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos (ver figura 25).

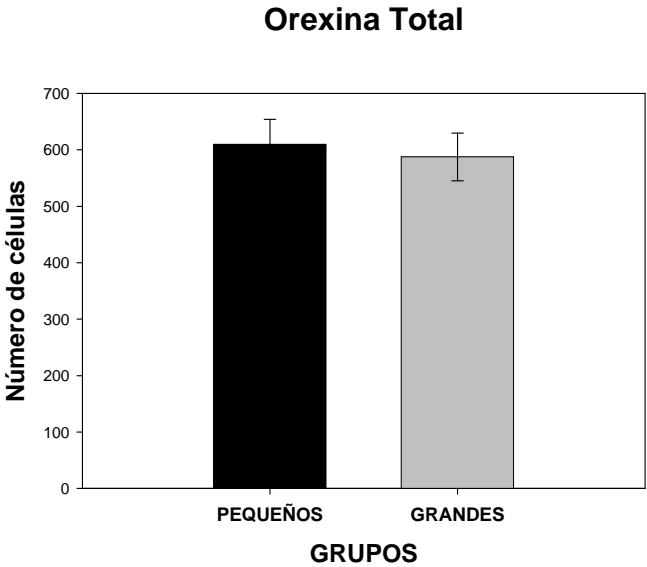


Figura 25. Promedio de número total de células productoras de orexina de las crías pequeñas (negro; $n=5$) y grandes (gris; $n=6$).

DISCUSIÓN

Peso corporal

Conforme a lo esperado, se obtuvieron camadas con crías chicas y grandes cuya diferencia de peso al nacimiento fue igual o mayor a 10%; excepto una camada en la que los pesos de las crías no difirieron; dicha camada fue eliminada. En la mayoría de las parejas formadas, la diferencia de peso se mantuvo hasta el día 30 de edad. Dichas diferencias persistieron, e incluso se pronunciaron, hasta el día 120 de edad, día en el que se inició el régimen de dieta alta en grasa. Bajo este régimen las ratas del grupo de las pesadas mostraron una propensión mayor a subir de peso que sus contrapartes del grupo de ligeras. Los datos de este estudio indican que el peso corporal al nacimiento puede ser un indicador de la propensión a la obesidad. Esta relación ya se había sugerido anteriormente por Rothwell, y col., (1982), ellos observaron que las cepas de rata más pesadas son más propensas a la acumulación de grasa corporal. También se ha descrito que las ratas propensas a la obesidad presentan un peso corporal inicial mayor que las ratas resistentes, previo a la exposición a dieta alta en calorías (Levin, Triscari, Hogan, Sullivan, 1987). En otro estudio se examinaron ratas cuyas madres fueron alimentadas con dieta alta en grasas y que durante su vida tuvieron ad libitum dicha dieta, y se encontró que a la edad de 35 días el peso corporal de las ratas propensas fue significativamente mayor que el de las ratas resistentes, edad en que el fenotipo obeso no se había presentado aún (Leibowitz, Chang, Pamy, Hill, Gayles, et al, 2007).

Cambios en péptidos asociados al peso corporal

La técnica de inmunohistoquímica nos permitió apreciar fibras y cuerpos celulares de los diferentes péptidos propuestos. Su localización correspondió con reportes previos (Hahn, Breininger, Baskin, Schwartz, 1998; Brischoux, Fellmann, Risold, 2001; Nambu, Sakurai, Mizukami, Hosoya, Yanagisawa, et al, 1999).

Las diferencias entre los grupos de crías pesadas y ligeras se encontraron únicamente en la población celular MCH del área dorsal del hipotálamo, no así en las otras poblaciones de MCH, ni en las de los otros péptidos. Hasta donde conocemos, no existen otros trabajos en los que se hayan analizado estas poblaciones en crías de ratas con las características establecidas en el presente trabajo.

Se ha reportado que en hipotálamos de crías pequeñas provenientes de camadas grandes (20 individuos, por camada) y que por lo tanto crecen poco, comparados con hipotálamos de crías provenientes de camadas chicas (10 individuos) y que crecen óptimamente es mayor la expresión de ARNm para CART en el ARC a la edad de 25 días, mientras que la expresión de ARNm para NPY, MCH, POMC y Orexina no difiere entre ambos grupos (Remmers, Verhagen, Adan, Delemarre-van de Waal, 2008). A la edad de 380 días se encontró que las crías provenientes de camadas pequeñas presentaban en el ARC una mayor expresión de ARNm para POMC y para CART, mientras que en el resto de los péptidos evaluados no se encontraron diferencias. Estos hallazgos se pueden circunscribir a la perspectiva de la Programación metabólica, en la que circunstancias alimenticias adversas en períodos críticos de desarrollo tendrían efectos a largo plazo en los sistemas de regulación de la conducta alimenticia (McMillen, Adam, Mühlhäusler, 2005). En el presente estudio, en cambio, se buscó que las condiciones alimenticias de los sujetos fuesen no sólo homogéneas sino también lo menos restrictivas posibles, de ahí el establecimiento de camadas de 8 individuos.

Otro estudio evaluó la expresión de NPY y de Orexina A en hipotálamos de ratas carentes del receptor a leptina, a diferentes edades: 14, 28 y 70 días. Dichas ratas fueron separadas en dos grupos de acuerdo con su peso corporal, obesas o delgadas. A la edad de 28 días se encontró que las ratas delgadas presentaban una expresión de NPY reducida respecto a sus contrapartes obesas, y dicha diferencia se acentuaba a la edad de 70 días. La diferencia de peso corporal entre ambos grupos se consideró como una consecuencia de la expresión diferencial de NPY, aunque no se discutió cual sería la causa de tal (Park, Seong, Yiu, Kim, Lee, Lee, et al, 2005). La diferencia en la expresión de NPY a los 28 días contrasta con datos en este estudio, en el que no encontramos diferencias en-

tre individuos grandes y chicos. Esto podría estar relacionado con el genotipo de los sujetos. Hay que recordar que las ratas Zucker muestran un incremento en la expresión de ARNm para NPY a edades tan tempranas como el día 2 postnatal, respecto a sus contrapartes normales (Kowalski, Houpt, Jahng, Okada, Liu, et al, 1999).

El hecho de que en los estudios de Park y de Remmers se encontraron diferencias en las edades adultas puede sugerir que es posible encontrar diferencias en alguno de los péptidos evaluados en este trabajo, en los sujetos adultos pesados y ligeros. Las diferencias en el peso corporal en estos sujetos, que se acentúan conforme la edad avanza, podrían estar acompañadas de tales diferencias, a semejanza de los estudios citados. Por ejemplo, al inducirse obesidad por dieta hipercalórica en ratones normales, no se encuentran diferencias en la expresión de ARNm para POMC, cuando los pesos corporales no difieren significativamente, sino hasta una etapa tardía de la inducción (19 semanas), en la cual la obesidad de los ratones es manifiesta y los niveles de leptina circulante son de casi 6 veces los de los ratones normales (Lin, Storlien, Huang, 2000).

La comparación entre ratas propensas a la obesidad contra ratas resistentes que permanecen delgadas ha aportado mayor conocimiento sobre la posible participación del hipotálamo en el balance energético y el peso corporal. Las ratas propensas a la obesidad inducida por dieta presentan un decremento del número de células tanto CART como α -MSH en el núcleo arqueado (Tian, Li, Shi, Wan, Wang, et al, 2004), que son poblaciones anorexigénicas. Igualmente ratones propensos a la obesidad inducida por dieta presentan niveles reducidos en la expresión de ARNm para POMC en el núcleo arqueado del hipotálamo (respecto a sus contrapartes resistentes (Huang, Han, South, Storlien, 2003).

En los roedores propensos a la obesidad y los resistentes también se han evaluado otras variables metabólicas como la eficiencia energética, que refleja la cantidad de energía almacenada en el cuerpo; y el coeficiente de respiración, un índice de oxidación que indica la naturaleza de las moléculas, grasas o carbohidratos, usadas para producir energía. En ratas propensas a la obesidad se encontró una eficiencia para acumulación energética incrementada respecto a las ratas resistentes, así como un coeficiente de respira-

ción más bajo, lo cual es indicativo de un uso de grasas como sustrato energético (Chang, Graham, Yakubu, Lin, Peters, et al , 1990). Otra variable que ha mostrado ser distinta entre ambos grupos es la actividad del sistema nervioso autónomo. Por ejemplo, se ha observado que las ratas propensas muestran una actividad simpática decrementada, al encontrarse que sus niveles de insulina en plasma son menores que los de las ratas resistentes, en conjunto con una menor liberación de norepinefrina al páncreas y al corazón (Levin, Triscari, Hogan, Sullivan, 1987). Sin embargo, otros trabajos presentan datos distintos; por ejemplo, las ratas propensas a la obesidad muestran un incremento en los niveles de norepinefrina ante un evento estresante (frío), pero un decremento en los niveles de epinefrina ante otro evento estresante (inmovilización), comparados con sujetos no obesos alimentados con dieta normal. Sin embargo, en condiciones basales muestran niveles de liberación de norepinefrina menores que los controles, en corazón y aorta, páncreas y tejido graso pardo (Levin, Triscari, Sullivan, 1983). Es importante resaltar que la actividad simpática basal determina la utilización de la energía. De forma similar, las ratas propensas muestran niveles mayores de norepinefrina circulante que las ratas resistentes, ante la inducción de actividad simpática por la administración de un bolo de glucosa (Levin, Triscari, 1987). Así mismo, cepas de ratón propensas a la obesidad muestran una expresión incrementada de proteína desacoplada 1 (un indicador de termogénesis) en el tejido graso pardo, respecto a cepas resistentes (Surwit, Wang, Petro, Sanchis, Raimbault, et al, 1998).

Hay que tomar en cuenta que estas observaciones fueron realizadas después de haberse establecido la obesidad inducida por dieta, y las respuestas observadas podrían ser un mecanismo compensatorio ante la ingestión calórica excesiva. Así, sería factible esperar que las ratas que se mantuvieron con un peso menor, aun bajo el régimen de dieta hipercalórica, presentaran un uso más eficiente de las grasas como sustrato energético que las ratas pesadas. Esto ha sido observado en un estudio en el que se evaluó el metabolismo de las grasas, y se encontró que las ratas propensas presentaron indicios de una menor oxidación de la grasa en el tejido muscular respecto a las resistentes, a los 35 días de edad, una edad en la que la obesidad no se había presentado aún (Leibowitz, Chang, Pamy, Hill, Gayles, et al, 2007).

Propensión a la obesidad y MCH

La MCH ha sido relacionada con el peso corporal y el gasto energético. Los ratones Ko de MCH son más pequeños que los normales, su peso se encuentra reducido desde una edad temprana, y la proporción de grasa corporal también se encuentra reducida. Estos ratones nulos de MCH presentan una reducción en la ingestión de alimento y al explorarse parámetros de la tasa metabólica, se encontró un consumo de oxígeno incrementado. (Shimada, Tritos, Lowell, Flier, Marathos-Flier, 1998). Se evaluó el papel de la MCH al crearse un ratón doble ko, que carecía tanto del gen ob (se vuelve obeso) como del gen para MCH. Los ratones doble ko presentaron un fenotipo obeso atenuado, en conjunto con una disminución en el tejido graso comparado con el ratón ob/ob y su ingestión de alimento no difirió de la de los ratones ob; mientras que su actividad locomotora fue mucho mayor. El consumo de oxígeno también se presentó incrementado, incluso cuando el animal se encontraba en reposo. Ante la exposición al frío, el doble ko presenta una caída más lenta y menos drástica; y una expresión incrementada de proteína desacoplada 1 (UCP1). Es posible que los incrementos en el consumo de oxígeno y en la expresión de proteína desacoplada 1 del tejido graso pardo, resulten en un gasto energético incrementado (Segal-Lieberman, Bradley, Kokkotou, Carlson, Trombly, et al, 2003).

En dos cepas de ratones, una propensa a la obesidad inducida por dieta y otra resistente, a las que se les eliminó el gen para MCH; ambos fueron relativamente delgados, y tal delgadez fue resultado de un incremento en el gasto energético más que de hipofagia. Los ratones de la cepa resistente ko también presentaron un incremento en la actividad locomotora. Al ser retados con dieta alta en grasa, ambos tipos de ratón carente de MCH permanecieron delgados, al parecer como resultado de un incremento en la actividad locomotora y en la tasa metabólica (Kokkotou, Jeon, Wang, Marino, Carlson, et al, 2005). Ratones que sobreexpresan el MCH, al ser retados con una dieta alta en grasas, tienen una propensión a la obesidad incrementada con respecto a ratones normales con la misma dieta. Estos ratones también presentan hiperinsulinemia e hipertrofia de células beta (Ludwig, Tritos, Maitaitis, Kulkarni, Kokkotou, et al, 2001).

En conclusión estas observaciones indican que la MCH desempeña una función inhibitoria sobre el gasto energético de manera que la sobreexpresión de MCH lleva a una susceptibilidad a la obesidad. La actividad del grupo neuronal MCH llevaría a un estado anabólico, o de balance energético positivo.

En el presente estudio se encontró que la población neuronal MCH del hipotálamo dorsal es más numerosa en las ratas que son más pesadas desde el nacimiento y permanecen siéndolo hasta el destete. Este hallazgo está en concordancia con las observaciones descritas sobre el papel fisiológico de este péptido, aunque aún no están bien establecidas las rutas exactas y los mecanismos por los cuales la MCH ejercería su acción, o el nivel exacto de participación para la expresión de un fenotipo particular. Es claro que alteraciones en este sistema tienen repercusiones en el peso corporal y el gasto energético. Se ha propuesto que la MCH influye sobre la actividad del sistema nervioso autónomo, ya que la infusión intracerebroventricular de MCH levó a ratas a una reducción de la frecuencia cardíaca, y una reducción en la presión arterial (Messina, Overton, 2007). La inyección de MCH al Núcleo del Tracto Solitario (NTS) del tallo cerebral también provoca una disminución de la presión arterial, y una disminución de la frecuencia cardíaca en ratas. Ante una vagotomía, los efectos de MCH sobre la frecuencia cardíaca se redujeron (Brown, Chitravanshi, Kawabe, Sapru, 2007). Esta observación pone de relieve que la MCH puede estar modulando el funcionamiento del sistema nervioso autónomo. Se ha establecido también que muchas de las neuronas premotoras presimpáticas se localizan en el hipotálamo dorsomedial y lateral, y muchas de ellas expresan MCH (Kerman, Bernard, Rosenthal, Beals, Akil, et al, 2007). Por tanto es posible que la expresión diferencial en el peso corporal de las ratas usadas en el presente estudio esté influenciada por diferencias en la actividad del sistema nervioso autónomo, y en consecuencia de un gasto energético diferenciado.

La localización anatómica de la población de células MCH en la que se encontraron las diferencias corresponde al hipotálamo dorsomedial, que comprende NDM, y se extiende también a áreas adyacentes, particularmente el área dorsal (DiMicco, Zaretsky, 2007). El hipotálamo dorsal forma parte de la zona hipotalámica medial que consiste en una serie

de grupos celulares bien definidos, y se piensa que desempeña un papel importante en la iniciación de conductas motivadas específicas. La zona hipotalámica medial muestra proyecciones directas hacia el NMD, el cual a su vez, envía densas proyecciones hacia el NPV). En el NPV, se han descrito tres zonas que envían proyecciones al sistema autónomo: neuronas en la parte dorsal proyectan hacia neuronas preganglionares de la médula espinal, y neuronas en las partes ventral y lateral parvocelulares proyectan hacia el complejo vagal dorsal. El DMH pertenece a un sistema hipotalámico de generación de patrones visceromotores, incluye núcleos del hipotálamo anterior: Núcleo Preóptico Anteroven-tral, Núcleo Preóptico Anterodorsal, Núcleo Parastrial, Núcleo Mediano Preóptico, y Núcleo Periventricular Anteroven-tral (Thompson, Swanson, 2003). Estas consideraciones son importantes porque permiten ubicar al sistema de MCH en un macrosistema de regulación de las respuestas autónomas y su consecuente regulación del equilibrio y gasto energético y el peso corporal.

CONCLUSIONES

Este estudio confirmó que en una misma camada de ratas nacen crías grandes pesadas y crías de pequeñas y de bajo peso.

La relación de peso alto y bajo se mantiene en la mayoría de las crías hasta la edad adulta.

Se encontró que las células MCH del hipotálamo son las únicas que difieren en número entre estos dos grupos, correspondiendo a un mayor número de células MCH en las ratas grandes pesadas.

Datos de la literatura proponen el efecto del sistema MCH sobre el peso corporal puede estar mediado por el sistema nervioso autónomo.

Nuestros datos sugieren que la diferencia en el número de células MCH podría ser la causa de la diferencia de peso entre ambos grupos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.A., Bloom, S.R. (2003) Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* **144**(9): 3943-3949.
2. Alon, T., Friedman, J.M. (2006) Late onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *The Journal of Neuroscience* **26**(2): 389-397.
3. Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2001) *Neuroscience Exploring the Brain*, Second Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
4. Beck, B.; Burlet, A.; Bazin, R.; Nicolas, J.P.; Burlet, C. (1993) Elevated neuropeptide Y in the arcuate nucleus of young obese Zucker rats may contribute to the development of their overeating. *The Journal of Nutrition* **123**: 1168-1172
5. Berthoud, H.R. (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **26**:393-428.
6. Berthoud, H.R., (2007) Interactions between the “cognitive” and “metabolic” brain in the control of food intake. *Physiology and Behavior* **91**: 486-498.
7. Brischoux, F.; Fellmann, D.; Risold, P.Y. (2001) Ontogenetic development of the diencephalic MCH neurons: a hypothalamic “MCH area” hypothesis. *European Journal of Neuroscience* **13**: 1733-1744.
8. Brown, S.N., Chitravanshi, V.C., Kawabe, K., Sapru, H.N. (2007) Microinjections of melanin concentrating hormone into the nucleus tractus solitarius of the rat elicit depressor and bradycardic responses. *Neuroscience* **150**: 796-806.
9. Buijs, R.M., Chun, S.J., Nijima, A., Romijn, H.J., Naga, K. (2001) Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *The Journal of Comparative Neurology* **431**: 405-423.
10. Cai, X.J.; Widdowson, P.S.; Harrold, J.; Wilson, S.; Buckingham, R.E.; Arch, J.R.S.; Tadayyon, M.; Clapham, J.C.; Wilding, J.; Williams, G. (1999) Hypothalamic orexin expression modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* **48**(11): 2132-2137

11. Canteras, N.S. (2001) The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **71**: 481-491.
12. Challis, B.G., Coll, A.P., Yeo, G.S.H., Pinnock, S.B., Dickson, S.I., Thresher, R.R., Dixon, J., Zhan, D., Rochford, J.J., White, A., Oliver, R.L., Millington, G., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., Russ, A.P., Carlton, M.B., O'Rahilly, S. (2004) Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY₃₋₃₆. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(13): 4695-4700.
13. Chang, S., Graham, B., Yakubu, F., Lin, D., Peters, J.C., Hill, J.O. (1990) Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **259**:R1103-R1110.
14. Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X-M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J.M., Strack, A.M., Camacho, R.E., Mellin, T.N., Nunes, C.N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., MacIntyre, D.E., Chen, H.Y., Van Der Ploeg, L.H.T. (2000) Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature Genetics* **26**: 97-102
15. Chen, Y., Hu, C., Hsu, C-K., Zhang, Q., Bi, C., Aniscar, M., Hsiung, H.M., Fox, N., Sliker, L.J., Yang, D.D., Heiman, M.L., Shi, Y. (2002) Targeted disruption of the melanin concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* **143**(7): 2469-2477.
16. Cheung, C.C., Clifton, D.K., Steiner, R.A. (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* **138**(10): 4489-4492.
17. Clegg, D.J., Benoit, S.C., Reed, J.A., Woods, S.C., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E. (2005) Reduced anorectic effects of insulin in obesity-prone rats fed a moderate fat diet. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **288**: R981-R986.
18. Coll, A.P. (2007) Effects of pro-opiomelanocortin (POMC) on food intake and body weight: mechanisms and therapeutic potential?. *Clinical Science* **113**; 171-182.

19. Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J. (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**: 480-482
20. Date, Y.; Ueta, Y.; Yamashita, H.; Yamaguchi, H.; Matsukura, S.; Kangawa, K.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Nakazato, M. (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 748-753.
21. DiMicco, J.A., Zaretsky, D.V. (2007) The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **292**: R47-R63.
22. Dube, M.G.; Kalra, S.P.; Kalra, P.S. (1999) Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins. Identification of hypothalamic sites of action. *Brain Research* **842**: 473-477.
23. Elias, C.F.; Saper, C.B.; Marathos-Flier, E.; Tritos, N.A.; Lee, C.; Kelly, J.; Tatro, J.B.; Hoffman, G.E.; Ollmann, M.M.; Barsh, G.S.; Sakurai, T.; Yanagisawa, M.; Elmquist, J.K. (1998) Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Journal of Comparative Neurology* **402**: 442-459
24. Griffond, B.; Risol, P-Y.; Jaquemard, C.; Colard, C.; Fellman, D. (1999) Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neuroscience Letters* **262**: 77-80
25. Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., Barsh, G.S., Horvath, T., Brüning, J.C. (2005) Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature Neuroscience* **8**(10): 1289-1291.
26. Hahn, T.M.; Breininger, J.F.; Baskin, D.G.; Schwartz, M.W. (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience* **1**(4): 271-272.

27. Håkansson, M-L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C., Meister, B. (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *The Journal of Neuroscience* **18**(1):559-572.
28. Haines, D.E. (2006) *Fundamental neuroscience for basic and clinical applications*. 3rd edition. Churchill Livingstone Elsevier. Philadelphia
29. Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M. (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**: 543-546
30. Hara, J.; Beuckmann, C.T.; Nambu, T.; Willie, J.T.; Chemelli, R.M.; Sinton, C.M.; Sugiyama, F.; Yagami, K-I.; Goto, K.; Yanagisawa, M.; Sakurai, T. (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia and obesity. *Neuron* **30**: 345-354
31. Havel, P.J.; Larsen, P.H.; Cameron, J.L. (2000) Control of food intake. En: Conn, P.M.; Freeman, M.E. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Humana Press. Totowa.
32. Haynes, A.C.; Chapman, H.; Taylor, C.; Moore, G.B.T.; Cawthorne, M.A.; Tadayyon, M.; Clapham, J.C.; Arch, J.R.S. (2002) Anorectic, thermogenic and anti-obesity activity of a selective orexin-1 receptor antagonist in *ob/ob* mice. *Regul Pept* **104**: 153-159
33. Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Harrison, D., Meakin, J., Maycox, P., Nasir, S., Leslie, R.A. (2000) The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor gene, *slc-1*, in the central nervous system of the rat. *European Journal of Neuroscience* **12**: 1194-1216.
34. Horvath, T.L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S.P., Leranath, C. (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research* **756**: 283-286.
35. Horvath, T.L.; Diano, S.; van den Pol, A.N. (1999) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *Journal of Neuroscience* **19**(3): 1072-1087

36. Huang, X., Han, M., South, T., Storlien, L. (2003) Altered levels of POMC, AgRP and MC-4R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Research* **992**: 9-19.
37. Huang, X-F., Han, M., Storlien, L. (2003) The level of NPY receptor mRNA expression in diet-induced obese and resistant mice. *Molecular Brain Research* **115**: 21-28.
38. Huang, X-F., Huang, X., Han, M., Chen, F., Storlien, L., Lawrence, A.J. (2004) 5-HT_{2A/2C} receptor and 5-HT transporter densities in mice prone or resistant to chronic high-fat diet-induced obesity: a quantitative autoradiography study. *Brain Research* **1018**: 227-235.
39. Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., Lee, F. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**: 131-141.
40. Ida, T., Nakahara, K., Katayama, T., Murakami, N., Nakazato, M. (1999) Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Research* **821**: 526-529.
41. Irani, B.G., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E. (2006) Altered hypothalamic leptin, insulin, and melanocortin binding associated with moderate-fat diet and predisposition to obesity. *Endocrinology* **148**(1): 310-316.
42. Kerman, I.A., Bernard, R., Rosenthal, D., Beals, J., Akil, H., Watson, S.J. (2007) Distinct populations of presympathetic-premotor neurons express orexin or melanin-concentrating hormone in the rat lateral hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, **505**: 586-601.
43. Kokkotou, E., Jeon, J.Y., Wang, X., Marino, F.E., Carlson, M., Trombly, D.J., Marathos-Flier, E. (2005) Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **289**: R117-R124.

44. Kowalski, T.J., Houpt, T.A., Jahng, J., Okada, N., Liu, S-M., Chua Jr., S.C., Smith, G.P. (1999) Neuropeptide Y overexpression in the preweanling Zucker (*fa/fa*) rat. *Physiology and Behavior* **67**(4): 521-525
45. Leibowitz, K.L., Chang, G-Q., Pamy, P.S., Hill, J.O., Gayles, E.C., Leibowitz, S.F.(2007) Weight gain model in prepubertal rats: prediction and phenotyping of obesity-prone animals at normal body weight. *International Journal of Obesity* **31**: 1210-1221.
46. Levin, B.E., Dunn-Maynell, A.A.(1997) Dysregulation of arcuate nucleus preproneuropeptide Y mRNA in diet-induced obese rats. *The American Journal of Physiology* **272**: R1365-R1370.
47. Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A.(2002) Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **283**: R941-R948.
48. Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., Balkan, B., Keeseey, R.E. (1997) Selective breeding for diet induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **273**: 725-730.
49. Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., Banks, W.A. (2004) Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **286**: R143-R150.
50. Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., Ricci, M.R., Cummings, D.E. (2003) Abnormalities of leptin and ghrelin regulation in obesity-prone juvenile rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **285**: 949-957.
51. Levin, B.E., Triscari, J.(1987) Glucose-induced norepinephrine levels and obesity resistance. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **253**:R475-R481.
52. Levin, B.E., Triscari, J., Hogan, S., Sullivan, A.C. (1987) Resistance to diet-induced obesity: food intake, pancreatic sympathetic tone, and insuline. *The American Journal of Physiology* **252**: R471-R478

53. Levin, B.E., Triscari, J., Sullivan, A.C. (1983) Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity. *American Journal of Physiology, Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **244**:R347-R355.
54. Levine, J. (2000) The hypothalamus as a major integrating center. En: Conn, P.M., Freeman, M.E. *Neuroendocrinology in physiology and medicine*. Humana Press. Totowa.
55. Lewis, D.E., Shellard, L., Koeslag, D.G., Boer, D.E., McCarthy, H.D., McKibbin, P.E., Russel, J.C., Williams, G. (1993) Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *American Journal of Physiology* **264**: E279-E284
56. Lin, S., Storlien, L.H., Huang X-F. (2000) Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Research* **875**: 89-95
57. López, M., Seoane, L., García, M.C., Lago, F., Casanueva, F.F., Señarís, R., Diéguez, C. (2000) Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochemical and Biophysical Research communications* **269**: 41-45.
58. Ludwig, D.S., Mountjoy, K.G., Tatro, J.B., Gillette, J.A., Frederich, R.C., Flier, J.S., Maratos-Flier, E. (1998) Melanin-concentrating hormone. A functional melanocortin antagonist in the hypothalamus. *American Journal of Physiology* **274**(4): E627-633.
59. Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., Maratos-Flier, E. (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation* **102**: 379-386.
60. Maffei, M., Fei, H., Lee, G-H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca R., Negrel, R., Ailhaud, G., Friedman, J.M. (1995) Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the *db* locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 6957-6960
61. Marsh, D.J.; Weingarth, D.T.; Novi, D.E.; Chen, H.Y.; Trumbauer, M.E.; Chen, A.S.; Guan, X.M.; Jiang, M.M.; Feng, Y.; Camacho, R.E.; Shen, Z.; Frazier, E.G.; Yu, H.; Metzger, J.M.; Kuca, S.J.; Shearman, L.P.; Gopal-Truter, S.; MacNeill, D.J.; Strack,

- A.M.; Macintyre, D.E.; Van der Ploegg, L.H.T.; Qian, S. (2002) Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**(5): 3240-3245
62. McMillen, C., Adam, C.L., Mühlhäusler, B.S. (2005) Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *Journal of Physiology* **565**(1): 9-17.
63. Messina, M.M., Overton, J.M. (2007) Cardiovascular effects of melanin-concentrating hormone. *Regulatory Peptides* **139**:23-30.
64. Mondal, M.S.; Nakazato, M.; Date, Y.; Murakami, N.; Yanagisawa, M.; Matsukura, S. (1999) Widespread distribution of orexin in rat brain and its regulation upon fasting. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**: 495-499
65. Morley, J.E.; Levine, A.S.; Gosnell, A.B.; Kneip, J. Grace, M. (1987) Effect of neuropeptide Y on ingestive behaviors in the rat *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **252**: 599-609
66. Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., Cone, R.D. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Endocrinology* **8**(10): 1298-1307
67. Nambu, T.; Sakurai, T.; Mizukami, K.; Hosoya, Y.; Yanagisawa, M.; Goto, K. (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research* **827**: 243-260
68. Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*, **278**: 135-138.
69. Olszewski, P.K.; Wirth, M.M.; Shaw, T.J.; Grace, M.K.; Bilingtone, C.J.; Giraudo, S.Q.; Levine, A.S. (2001) Role of α -MSH, in the regulation of consummatory behavior: Immunohistochemical evidence. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **281**: R673-R680
70. Park, E.S., Seong, J.K., Yi, S.J., Kim, J.S., Lee, H.S., Lee, I.S., Yoon, Y.S. (2005) Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of obese and lean Zucker Diabetic Fatty rats. *Journal of Veterinary Medical Science* **67**(7): 639-646.

71. Park, E.S.; Yi, S.J.; Kim, J.S.; Lee, H.S.; Lee, I.S.; Seong, J.K.; Jin, H.K.; Yoon, Y.S. (2004) Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high fat diet fed rats. *Journal of Veterinary Science* **5**(4): 295-302
72. Paxinos, G., Watson, C. (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, fourth edition. Academic Press, San Diego.
73. Pinto, S.; Roseberry, A.G.; Liu, H.; Diano, S.; Shanabrough, M.; Cai, S.; Friedman, J.M. Horvath, T.L. (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* **304**: 110-115.
74. Qu, D.; Ludwig, D.S.; Gammeltoft, S.; Piper, M.; Pelleymounter, M.A.; Cullen, M.J.; Mathes, W.F.; Przypek, J.; Kanarek, R.; Marathos-Flier, E. (1996) A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**: 243-247)
75. Rao, T.L., Kokare, D.M., Sarkar, S., Khisti, R.T., Chopde, C.T., Subdehar, N. (2003) GABAergic agents prevent alpha-melanocyte stimulating hormone induced anxiety and anorexia in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **76**: 417-423.
76. Raposinho, P.D., White, R.B., Aubert, M.L. (2003) The melanocortin antagonist Melanotan-II reduces the orexigenic and adipogenic effects of neuropeptide Y (NPY) but does not affect the NPY-driven suppressive effects on the gonadotropic and somatotrophic axes in the male rat. *Journal of Neuroendocrinology* **15**(2): 173-181.
77. Remmers, F., Verhagen, L.A.W., Adan, R.A.H., Delemarre-van de Waal, H.A. (2008) Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology* **149**(7): 3617-3625.
78. Rossi, M.; Choi, S.J.; O'Shea, D.; Miyoshi, T.; Ghatei, M.A.; Bloom, S.R. (1997) Melanin Concentrating Hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology* **138**(1): 351-355)
79. Rothwell, N.J., Saville, E., Stock, M.J. (1982) Effects of feeding a "cafeteria" diet on energy balance and diet-induced thermogenesis in four strains of rat. *Journal of Nutrition* **112**(8): 1515-1524.
80. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S.,

- Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J., Yanagisawa, M. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**(4): 573-585
81. Segal-Lieberman, G.; Bradley, R.L.; Kokkotou, E.; Carlson, M.; Trombly, D.J.; Wang, X.; Bates, S.; Myers Jr., M.G.; Flier, J.S.; Marathos-Flier, E. (2003) Melanin concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** (17): 10085-10090.
82. Shimada, M.; Tritos, N.A.; Lowell, B.B.; Flier, J.S.; Marathos-Flier, E. (1998) Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* **396**: 670-674.
83. Snell, R.S. (2003) *Neuroanatomía clínica*. 5a edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
84. Stanley, B.G; Kyrkouli, S.E.; Lampert, S.; Leibowitz, S.F. (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of obesity. *Peptides* **7**: 1189-1192
85. Ste.Marie, L., Miura, G.I., Marsh, D.J., Yagaloff, K., Palmiter, R.D.(2000) A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(22): 12339-12344
86. Surwit, R.S. Wang, S., Petro, A.E., Sanchis, D., Raimbault, S., Riquier, D., Collins, S. (1998) Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 4061-4065.
87. Suzuki, R.; Shimojima, H.; Funahashi, H.; Sakajo, S.; Yamada, S.; Guan, J-L.; Tsurugano, S.; Uehara, K.; Takeyama, Y.; Kikuyama, S.; Shioda, S. (2002) Orexin-1 receptor immunoreactivity in chemically identified target neurons in the rat hypothalamus. *Neuroscience Letters* **324**: 5-8.
88. Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., Baskin, D.G. (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation* **98**(5): 1001-1006.

89. Takahashi, K.A., Cone, R.D. (2005) Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/agouti related protein neurons. *Endocrinology* 146(3): 1043-1047.
90. Thompson, R.H., Swanson, L.W. (2003) Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. *Brain Research Reviews* 41: 153-202.
91. Tian, D-R., Li, X.D., Shi, Y-S., Wan, Y., Wang, X-M., Chang, J-K., Yang, J., Han, J-S. (2004) Changes of hypothalamic α -MSH and CART expression in diet-induced obese rats. *Peptides* 25: 2147-2153.
92. van den Top, M.; Lee, K.; Whyment, A.D.; Blanks, A.M. Spanswick, D. (2004) Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature Neuroscience* 7(5): 493-494
93. Waxman, S.G. (2004) *Neuroanatomía clínica*. 13a edición. Editorial El Manual Moderno. México.
94. Yamamoto, Y.; Ueta, Y.; Hara, Y.; Serino, R.; Nomura, M.; Shibuya, I.; Shirahata, A.; Yamashita, H. (2000) Postnatal development of orexin/hypocretin in rats. *Molecular Brain Research* 78: 108-119
95. Yamamoto, Y.; Ueta, Y.; Serino, R.; Nomura, M.; Shibuya, I.; Yamashita, H. (1999) Effects of restriction on the hypothalamic *prepro-orexin* gene expression in genetically obese mice. *Brain Research Bulletin* 51(6): 515-521
96. Yang, Y.K., Thompson D.A., Dickinson, C.J., Wilken, J., Barsh, G.S., Kent, S.B., Gantz, I. (1999) Characterization of Agouti-related protein binding to melanocortin receptors. *Molecular Endocrinology* 13 (1): 148-155.
97. Yaswen, L.; Diehl, N.; Brennan, M.B.; Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse of pro-opiomelanocortin deficiency responds to periferal melanocortin. *Nature Medicine* 5; 9: 1066-1070.