



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

*EFFECTO DE LA GALANTAMINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES
IMPLICADOS EN LA BALANZA ENERGÉTICA*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN NEUROCIENCIAS

PRESENTA:

POLA LUZ BÁTIZ SLAZAK

ASESORA:

DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR
FACULTAD DE MEDICINA

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2022

Facultad de Medicina



NEUROCIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente: Dra. Lourdes Massieu Trigo

Vocal: Dra. Yazmín Macotela Guzmán

Secretario: Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

1er suplente: Dra. Andrea Sachi Díaz Villaseñor

2do suplente: Dr. Francisco Torres Quiroz

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Investigación, Facultad de Medicina, UNAM

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes, Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG).

Pola Luz Bátiz Slazak

Sustentante

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar

Asesor del tema

Índice

<i>Índice de figuras</i>	7
<i>Índice de tablas</i>	8
<i>Resumen</i>	9
<i>Introducción</i>	11
Enfermedades neurodegenerativas: el Alzheimer.....	11
Acetilcolina.....	13
Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer.....	14
Efectos de los inhibidores de AChE sobre el peso corporal de los pacientes con la EA ..	16
Balanza energética.....	17
Expresión génica de la enzima AChE en el hipotálamo.....	20
Selección del medicamento inhibidor de la AChE.....	22
Galantamina.....	23
<i>Planteamiento del problema</i>	24
<i>Hipótesis</i>	25
<i>Objetivos</i>	25
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos.....	25
<i>Materiales y métodos</i>	26
Cultivo celular.....	26
Conteo celular.....	26
Preparación del medicamento para cultivo celular.....	27
Tratamiento de células.....	28
Extracción del RNA.....	28
Cuantificación del RNA por espectrofotometría.....	29
Síntesis de cDNA por reacción de transcriptasa reversa (RT).....	30
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	31
Análisis estadístico.....	33
<i>Resultados</i>	33
Optimización del número de células por pozo.....	34
Optimización de las sondas Taqman.....	35
Expresión de <i>AgRP</i> , <i>NPY</i> , <i>CART</i> y <i>MC4R</i> en la optimización de condiciones de privación de glucosao diferentes concentraciones de glucosa a diversos tiempos.....	40

Expresión de <i>AgRP</i>, <i>NPY</i>, <i>CART</i> y <i>MC4R</i> en la optimización de diferentes concentraciones de galantamina.....	44
Efecto de la galantamina sobre la expresión de <i>AgRP</i>, <i>NPY</i>, <i>CART</i> y <i>MC4R</i> en presencia de diferentes concentraciones de glucosa	46
<i>Discusión</i>.....	49
<i>Limitantes del trabajo</i>	58
<i>Conclusión</i>	59
Perspectivas.....	60

Abreviaturas

Acetilcolina (ACh)

Acetilcolinesterasa (AChE)

Ácido clorhídrico (HCl)

Ácido ribonucleico mensajero (mRNA)

Ácido γ -aminobutírico (GABA)

Amortiguador de pH de fosfatos salino (PBS)

Proteína precursora amiloidea (APP)

Barrera hematoencefálica (BHE)

β -amiloide ($A\beta$)

β -mercaptoetanol (2-ME)

Butiril acetilcolinesterasa (BChE)

Cinasa regulada por señales extracelulares (ERK)

Colina acetiltransferasa (ChAT)

Citocromo P450 (CYP)

Cycle threshold (CT)

Día embrionario (EX)

Día post-natal (PX)

DNA complementario (cDNA)

Enfermedad de Alzheimer (EA)

Hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH)

Knock-out (KO)

Neuropéptido Y (NPY)

Núcleo arqueado (NAc)
Núcleo basal de Meynert (NBM)
Núcleo paraventricular (PVN)
PCR en tiempo real (qPCR)
Péptido regulado por cocaína y anfetamina (*CART*)
Proopiomelanocortina (*POMC*)
Proteína R-agouti (*AgRP*)
Reacción de transcriptasa reversa (RT)
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
Receptor acoplado a proteína G (GPCR)
Receptor de leptina (LepR)
Receptor de melanocortina 4 (*MC4R*)
Receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR)
Receptores nicotínicos (nAChR)
Sistema Nervioso Central (SNC)
Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS)
Suero fetal bovino (FBS)

Índice de figuras

Figura 1: Esquema de la degradación de la acetilcolina mediante la enzima AChE.

Figura 2: Esquema de la señalización orexigénica y anorexigénica en el núcleo arqueado del hipotálamo.

Figura 3: Expresión proteica de la AChE en el cerebro.

Figura 4: Expresión de *ACHE* en los núcleos paraventricular y arqueado del hipotálamo de humano.

Figura 5: Curva de proliferación celular a densidades crecientes.

Figura 6: Curvas de amplificación de los genes *L32*, *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R* y *POMC* a diferentes concentraciones de cDNA y de sonda.

Figura 7: Expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R* y *POMC* en medio completo sin tratamiento en las células IVB hipotalámicas de rata.

Figura 8: Porcentaje de expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* al optimizar con diferentes concentraciones de galantamina.

Figura 9: Porcentaje de expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* al optimizar con diferentes concentraciones de galantamina.

Figura 10: Expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* en presencia o ausencia de galantamina con estímulos de privación de glucosa y diferentes concentraciones de glucosa.

Figura 11: Efecto de la galantamina sobre el gen *AgRP* y *MC4R* en la línea celular hipotalámica IVB.

Índice de tablas

Tabla 1. Valores de CTs para las sondas de *L32*, *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R* y *POMC* a diferentes concentraciones sonda y cDNA.

Tabla 2. Condiciones óptimas de concentración de sonda y de cDNA para la cuantificación del transcrito de cada gen (*L32*, *NPY*, *AgRP*, *MC4R*, *CART* y *POMC*) por medio de qPCR.

Resumen

Una de las enfermedades neurodegenerativas más importantes debido a su alta prevalencia es la enfermedad de Alzheimer (EA), la cual es la causa más común de demencia y pérdida de memoria en gente mayor a 60 años. Uno de los tratamientos más utilizados para el tratamiento de la EA son los inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), como por ejemplo la galantamina, que se encarga de evitar que la acetilcolina se degrade por medio de la AChE. Se sabe también que este medicamento causa fuertes y frecuentes efectos secundarios como náuseas, vómito, mareos, dolor de cabeza, diarrea y anorexia. Además, la galantamina se ha visto asociada a una reducción de peso en algunas personas.

La AChE se encuentra expresada en el hipotálamo, en muchas regiones del sistema nervioso, incluyendo el hipotálamo, en los núcleos encargados de la balanza energética, la cual regula la ingesta alimentaria y el gasto energético. En el hipotálamo, se generan dos cascadas de señalización: una con respuesta anorexigénica: por medio de los genes que codifican para proopiomelanocortina (*POMC*) y para el péptido regulado por cocaína y anfetamina (*CART*), y otra con respuesta orexigénica dada por el neuropéptido Y (*NPY*) y la proteína relacionada con agouti (*AgRP*). Los productos de *POMC* (α -MSH) y *AgRP* se unen al receptor de melanocortina 4 (*MC4R*). Por otra parte, se ha reportado que estos genes también están asociados con la enfermedad de Alzheimer.

El objetivo de este proyecto es ver si la galantamina, la cual reduce el peso corporal, tiene un efecto en la expresión de los genes implicados en la balanza energética. Para esto, se utilizó la línea celular IVB hipotalámica de rata, la cual fue

estimulada con galantamina en condiciones de privación de glucosa (0 mM) y diferentes concentraciones de glucosa (4.5 mM y 11 mM). Finalmente, se midieron los transcritos de dichos genes.

Se reportó que para el gen *AgRP* (gen orexigénico), al incubar a las células en presencia de galantamina + 11 mM de glucosa, la expresión disminuyó con respecto a las células tratadas sin medicamento + 11 mM de glucosa. Por otro lado, para el gen del receptor *MC4R*, en presencia de galantamina, la expresión disminuyó en la privación de glucosa con 11 mM en presencia de galantamina, comparadas con las células que no fueron estimuladas con el medicamento.

Finalmente, para los genes *CART* (anorexigénico) y *NPY* (orexigénico), no se encontraron diferencias entre los tratamientos con y sin galantamina; mientras que *POMC* (anorexigénico) no se encontró expresado en esta línea celular.

Por lo tanto, la disminución de la expresión de *AgRP* en presencia de galantamina, sugiere que al haber una reducción del péptido orexigénico, la ingesta de alimentos disminuiría y podría explicar la pérdida de peso en pacientes con Alzheimer.

Introducción

Enfermedades neurodegenerativas: el Alzheimer

Las enfermedades neurodegenerativas son aquellas que pudieran presentar, una disfunción cognitiva progresiva o motora, dada por una pérdida de neuronas, que es considerada una causa común de morbilidad y mortalidad, principalmente en gente adulta mayor (Erkkinen et al., 2018). Estas enfermedades se caracterizan generalmente, por depósitos de proteínas, tanto intracelulares como extracelulares, que afectan las propiedades fisicoquímicas del cerebro, así como la homeostasis iónica y energética o el metabolismo celular; sin embargo, también pueden ser desarrolladas por mutaciones génicas específicas (Kovacs, 2018).

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, la cual es la causa más común de demencia, pérdida de memoria y de funciones cognitivas en gente mayor a 60 años (60 - 70% de los casos, según la Organización Mundial de la Salud, OMS, 2020). La demencia se define como la incapacidad intelectual de gravedad suficiente para interferir con el funcionamiento tanto social como laboral. Estudios epidemiológicos muestran que la EA tiene una prevalencia del 7.5% en gente latina entre 64 a 74 años, del 27.9% en un rango de 75 a 84 años y un 62.9% de casos en personas mayores a 85 años. En México, se ha reportado que, en individuos mayores de 60 años, la prevalencia de la demencia es del 8% y que puede haber más de 800,000 casos con diagnóstico específico para la EA (Vega et al., 2017; Assal, 2019).

La principal característica de EA es la pérdida de la memoria, dada por dos factores, principalmente: 1) la acumulación de la beta-amiloide y 2) acumulación de la proteína tau hiperfosforilada. El primero es la acumulación de la beta-amiloide (placas

A β), proteína que tiene funciones como actividad antimicrobiana, reparación de fugas en la barrera hematoencefálica, supresión de tumores y la transmisión de información neuronal (Abramov et al., 2009; Brothers et al., 2018). El péptido A β es el producto de la digestión de la proteína precursora del amiloide (APP). Bajo condiciones patológicas, la APP se corta mediante un conjunto de enzimas conocidas como β y γ -secretasas, las cuales están presentes en la membrana celular. Después de la digestión de la APP, aparecen monómeros extracelulares que, entre ellos, se acercan para formar oligómeros. Finalmente, los oligómeros se organizan y componen las láminas β . El acúmulo de dichas láminas forma las placas A β (Madav et al., 2019). Mientras que, el segundo es la acumulación de la proteína tau hiperfosforilada (ovillos neurofibrilares), que tiene su papel principal en la formación de microtúbulos (Ashrafian et al., 2021). Los cúmulos provocan una disminución del número de sinapsis, dendritas y de neuronas, esto último en las etapas más avanzadas de la enfermedad (etapas III y IV) (Hampel et al., 2018). Otros estudios muestran que también existe un decremento en los receptores nicotínicos postsinápticos y muscarínicos (M2, presinápticos) de la corteza cerebral (Nordberg & Winblad, 1986a; Rodrigo et al., 2007). Las placas A β y los ovillos neurofibrilares normalmente se encuentran en regiones anatómicas del encéfalo, comúnmente asociadas a los procesos de memoria, como son: el hipocampo y el núcleo basal de Meynert (NBM).

La pérdida de memoria se debe a la pérdida neuronal en el hipocampo y el NBM. En específico, este núcleo cuenta con neuronas colinérgicas que proyectan sus axones hacia la corteza parietal, que se encarga principalmente de la asociación de diferente tipo de información proveniente de otras áreas cerebrales. Además, los axones también

proyectan hacia la corteza frontal, implicada en consolidación y transformación de memorias procedentes del hipocampo (Hampel et al., 2018; Rodrigo et al., 2007) .

Acetilcolina

Las neuronas colinérgicas producen acetilcolina (Ach), la cual funciona como neurotransmisor. Ach se encarga de transferir la información neuronal por toda la corteza, en procesos como memoria, atención, aprendizaje, respuesta a estrés, sueño, memoria sensorial, entre otros.

La Ach es sintetizada por la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) en la neurona presináptica (aquella que va a transmitir el estímulo), a partir de los sustratos acetilcoenzima A y colina. Después de que las neuronas colinérgicas postsinápticas (quienes reciben el estímulo) son despolarizadas y activan el potencial de acción, la Ach restante en la hendidura sináptica es degradada por la enzima acetilcolinesterasa (AChE), generando colina y acetato (Ferreira-Vieira et al., 2016). En la EA es importante poder utilizar toda la Ach producida, para transmitir la información, ya que las neuronas colinérgicas se degradan durante el desarrollo de esta enfermedad. En la Figura 1 se presenta un esquema de la degradación de la Ach.

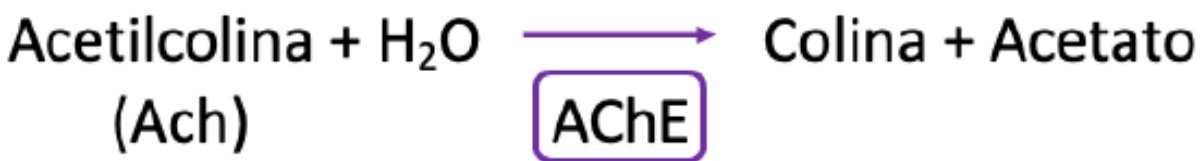


Figura 1: Esquema de la degradación de la acetilcolina mediante la enzima AChE. A partir de la acetilcolina (Ach) y una molécula de agua se obtiene la colina y el acetato, por medio de la acetilcolinesterasa (AChE).

Tratamientos para la enfermedad de Alzheimer

Se ha demostrado que en la EA existe una disminución progresiva de las neuronas colinérgicas debido a las placas $A\beta$, a la formación de ovillos neurofibrilares y a la sobreestimulación del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) (Robert Briggs, 2016; Shenhar-Tsarfaty et al., 2019) . Es por esto que, la mayoría de los tratamientos para la EA, se ha enfocado en el control de la vía de degradación de la Ach, como en la sobreestimulación del NMDAR.

Entre los medicamentos más utilizados para la EA están: 1) los inhibidores de AChE, que resultan en un bloqueo de la degradación de la Ach proveniente de las neuronas colinérgicas; y 2) los bloqueadores de los NMDAR. Sin embargo, en este proyecto sólo nos enfocaremos a los inhibidores de AChE. La importancia de la inhibición farmacológica de la AChE radica en que la Ach no se degrade, lo que conlleva a que se mantenga la comunicación neuronal íntegra.

Dicha inhibición puede ser competitiva, en la cual se bloquea la unión del ligando al sitio activo (zona enzimática donde se producen las reacciones); o no-competitiva, donde el ligando se une en otra parte que no es el sitio activo (Zemek et al., 2014).

Por ejemplo, dentro de los medicamentos contra la EA se encuentra la galantamina, que es un medicamento que tiene un mecanismo de acción dual, ya que es un inhibidor selectivo, reversible y competitivo de la AChE, la cual se encuentra en la neurona postsináptica. Además, es un modulador alostérico (que aumenta o disminuye la acción del fármaco de forma indirecta) de los receptores nicotínicos (nAChR), que se encuentran en la neurona presináptica. Los nAChRs pertenecen a familias de receptores de otros neurotransmisores como el ácido γ -aminobutírico (GABA, un neurotransmisor

inhibidor), la serotonina y la glicina (Nordberg, 2001). Los nAChR son moduladores en procesos de comunicación neuronal, como la memoria y se encuentran disminuidos en la EA (Nordberg & Winblad, 1986b). La modulación alostérica genera un cambio conformacional de los receptores, provocando el aumento de la liberación de Ach en la neurona colinérgica, así como el aumento de actividad de las neuronas vecinas (Farlow, 2003; Razay & Wilcock, 2008). Esto quiere decir que la galantamina además de inhibir a la AChE modula también la salida del glutamato, serotonina y GABA, actuando así en otros sistemas de neurotransmisores para mejorar los síntomas de la demencia (Maelicke & Albuquerque, 2000).

Otro medicamento utilizado para el tratamiento de la EA es la rivastigmina, el cual es un inhibidor no-competitivo pseudo-reversible de la AChE, que, además, tiene efectos sobre otra enzima parecida a la acetilcolinesterasa: la butiril acetilcolinesterasa (BChE). (Farlow, 2001; Nguyen et al., 2021). La rivastigmina genera una inhibición prolongada hasta de 10 horas (Jann, 2000). Sus propiedades lipofílicas e hidrofílicas hacen que ingrese al torrente sanguíneo y después cruce la barrera hematoencefálica (BHE), que es la interfaz entre la circulación y el sistema nervioso central (SNC) y que permite o restringe el paso de sustancias de forma muy selectiva, permitiendo una comunicación con la periferia (Nguyen et al., 2021; Obermeier et al., 2016).

Por último, el donepecilo funciona como un inhibidor no-competitivo reversible específicamente de la AChE, teniendo alta afinidad a los dos sitios de unión de esta (Farlow, 2001).

Todos los medicamentos descritos anteriormente, son fármacos que se le administran al paciente como primeros tratamientos contra la EA.

Efectos de los inhibidores de AChE sobre el peso corporal de los pacientes con la EA

Se ha descrito que alrededor del 50 al 60% de pacientes con EA presentan conductas alimentarias anormales y un 20 - 45% de los casos con EA tiene una pérdida de peso significativa, reconocida como característica clínica, previa al tratamiento (Vercruysse et al., 2018). Cabe destacar que la pérdida de peso sucede mucho antes que el diagnóstico para EA. (Droogsma et al., 2015). Sin embargo, los fármacos que se utilizan como tratamiento, presentan efectos secundarios que provocan una mayor pérdida de peso corporal, lo que afecta continuamente la salud del paciente.

Anteriormente, se ha reportado que medicamentos inhibidores de la AChE (galantamina, rivastigmina y donepecilo) generaron efectos secundarios muy frecuentes como náuseas, vómito, diarrea, mareos, dolor de cabeza y anorexia (Tan, 2014). Además, un metaanálisis demostró que de 3,423 pacientes con EA, algunos presentaron disminución de peso corporal ante el tratamiento con galantamina (4.32% de los pacientes), rivastigmina (2.34% de los pacientes), donepecilo (2.01% de los pacientes), y tratamiento mixto (4.38% de los pacientes, combinación de donepecilo + memantina, un inhibidor del receptor N-metil-D-aspartato, NMDAR). Dicho trabajo también reportó el decremento de la ingesta bajo galantamina (0.70% de los pacientes), rivastigmina (0.82 de los pacientes), donepecilo (0.42% de los pacientes), y tratamiento mixto (1.17% de los pacientes). Además, los pacientes con EA tratados con estos medicamentos presentaron anorexia con galantamina (7.83% de los pacientes), rivastigmina (5.17% de los pacientes), donepecilo (4.03% de los pacientes), y tratamiento mixto (3.54% de los

pacientes, combinación de donepecilo + memantina, un inhibidor del receptor N-metil-D-aspartato, NMDAR; Tsoi, et al., 2019).

Asimismo, se ha reportado que el tratamiento con galantamina, rivastigmina y donepecilo, puede ser interrumpido porque se presenta uno o más efectos adversos como sueños anormales, diarrea, mareo, dolor de cabeza, insomnio, heces blandas, calambres musculares, náuseas, vómito o pérdida de peso (Matsunaga et al., 2019).

Esto es de gran importancia, ya que la pérdida de peso en pacientes de edad avanzada, como los que padecen la EA, conlleva a otras patologías con implicaciones importantes en su salud, como la hipotensión, anemia, anorexia, pérdida de músculo esquelético, sarcopenia, entre otras (Miller, 2008).

Balanza energética

El peso corporal está regulado por la balanza energética (BE), dada por la ingesta de alimentos y el gasto calórico. La regulación de la BE está controlada por una compleja interacción entre órganos periféricos y el sistema nervioso central (SNC). En el SNC, el hipotálamo es uno de los núcleos determinantes en la regulación de la BE (Vercruysse et al., 2018).

Uno de los circuitos clave de la regulación de la BE, es la vía de leptina-melanocortina. La leptina es una hormona producida principalmente por el tejido adiposo que ejerce efectos sobre la balanza energética para reducir la ingesta y aumentar el gasto energético (Proulx & Seeley, 2005). Estos efectos están mediados por los receptores de la leptina (LepR) presentes en el hipotálamo.

Se han descrito dos cascadas de señalización que se activan cuando se une la leptina a su receptor. La primera es la vía del gen que codifica para la proopiomelanocortina (*POMC*) en el núcleo arqueado del hipotálamo, que genera el péptido precursor de *POMC* en las neuronas. Cuando se procesa *POMC*, se forma la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), el cual es un agonista del receptor de melanocortina 4 (*MC4R*), provocando una respuesta anorexigénica (Cone, 2006; Proulx & Seeley, 2005; Salvador & Frühbeck, 2005). Por otra parte, el gen codificante para el péptido regulado por cocaína y anfetamina (*CART*), se encuentra principalmente en los núcleos arqueado, paraventricular, dorsomedial y lateral en las neuronas productoras de *POMC*. Este péptido se une a un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y es capaz de activar la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), generando así una respuesta anorexigénica (Ahmadian-Moghadam et al., 2018; Kristensen et al., 1998).

La segunda cascada está dada por el neuropéptido Y (*NPY*) y la proteína relacionada con agouti (*AgRP*), ambas presentes y secretadas por las neuronas presentes en el núcleo arqueado del hipotálamo. Posteriormente, estos neuropéptidos se unen en el núcleo paraventricular del hipotálamo a sus receptores. *NPY* se une a los receptores Y1/Y5 y *AgRP* es el antagonista de *MC4R*, provocando así la respuesta orexigénica (Salvador & Frühbeck, 2005). Por lo tanto, *POMC* y *CART* son genes anorexigénicos; mientras que *NPY* y *AgRP* son orexigénicos y *MC4R* sólo codifica para el receptor, al cual se unen α -MSH y *AgRP*. De esta forma, dependiendo del péptido que se une al receptor *MC4R*, se regula la balanza energética, creando una respuesta metabólica (Figura 2; Schwartz et al., 2000).

Por otra parte, se sabe que los ratones *knock-outs* (KO) para el gen *MC4R* presentan hiperfagia y aumento de peso (Balthasar et al., 2005). Además, se ha visto que la glucosa disminuye la expresión de *MC4R* en la línea celular SH-SY5Y (Qin et al., 2020). Por otro lado, se ha reportado que la glucosa, en concentraciones de 5 mM, fomenta la expresión de genes anorexigénicos, como *POMC* (Ma, et al., 2008) y reduce la expresión del gen orexigénico *AgRP* (Chalmers et al., 2014). Sin embargo, a una dosis de 11 mM de glucosa, *POMC* se ve disminuido (Ma, et al., 2008).

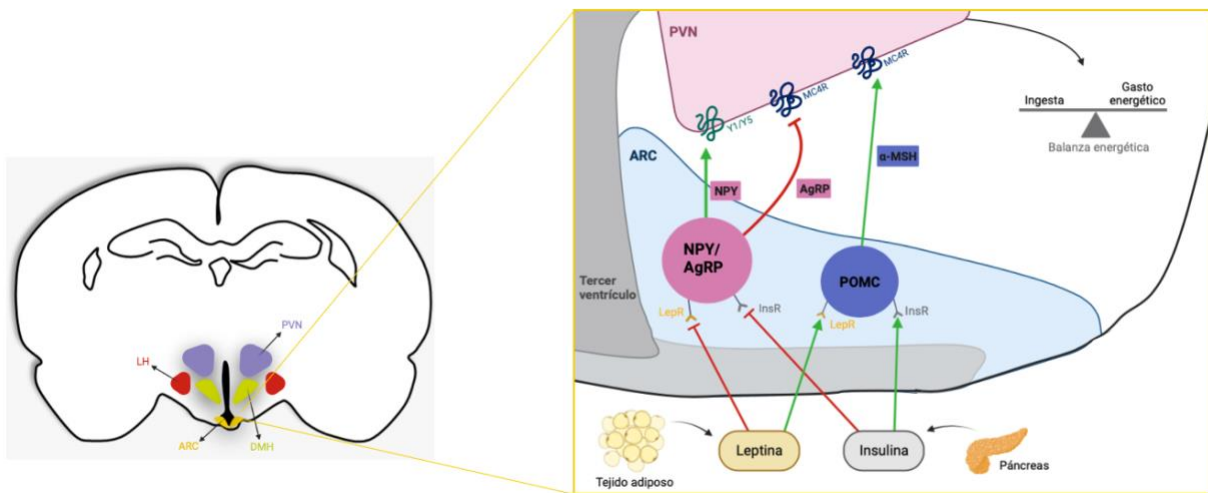


Figura 2: Esquema de la señalización orexigénica y anorexigénica en el núcleo arqueado del hipotálamo. Del lado izquierdo aparece un corte coronal del hipotálamo con sus diferentes estructuras. Del lado derecho aparece un acercamiento a la zona del arqueado donde se ilustra la unión de la leptina a sus receptores (LepR) en neuronas NPY/AgRP y POMC (precursor de α -MSH). Los péptidos se unen a MC4R de las neuronas blanco en el PVN para tener una respuesta orexigénica o anorexigénica sobre la balanza energética. LH: hipotálamo lateral; ARC: núcleo arqueado; DMH: hipotálamo dorsomedial; PVN: núcleo paraventricular. Flecha verde: acción; flecha roja: inhibición.

En la misma estructura donde se regula la balanza energética, el hipotálamo, se ha reportado que también se pueden encontrar los ovillos neurofibrilares, las placas

amiloideas y la pérdida neuronal, presentes en la EA (Ishii & Iadecola, 2015). Además, la enzima AChE se encuentra expresada en el hipotálamo (Parent & Butcher, 1976).

Por lo tanto, es posible que la pérdida de peso observada en pacientes con EA después de la administración de los fármacos inhibidores de AChE, se deba al control de genes reguladores de la balanza energética.

Antecedentes

Los medicamentos contra EA (inhibidores de la AChE) conllevan a la pérdida de peso en algunos pacientes, por lo que es posible que influyan en la expresión de genes en el núcleo arqueado del hipotálamo implicados en la balanza energética.

Anteriormente, se ha descrito que los ratones KO para la *AChE* presentan una disminución de peso, debilidad muscular y menos actividad motriz, aunque aumenta su ingesta calórica (Duysen et al., 2002). Esto permite pensar que la inhibición de la enzima AChE sea una posible vía por la cual los pacientes con EA pierdan de peso. Es por esto que se analizó si *ACHE* se encontraba expresada en el hipotálamo.

Expresión génica de la enzima AChE en el hipotálamo

Sabiendo que los medicamentos contra la EA cruzan la barrera hematoencefálica y están dirigidos contra AChE, es importante analizar si el gen que codifica para *ACHE*, se expresa en el hipotálamo.

Durante mis prácticas profesionales, se buscó la expresión proteica de la enzima AChE en el “Human Protein Atlas”, encontrando una alta expresión proteica en el hipotálamo, puente, médula, cerebelo y mesencéfalo (Figura 3).



Figura 3: Expresión proteica de la AChE en el cerebro. Se observa del lado izquierdo las regiones cerebrales y del lado derecho las barras que representan el nivel de expresión proteica de dos diferentes bases de datos. La mayor expresión se da en el hipotálamo (rojo). Foto tomada de la página de “The Human Protein Atlas”.

Al observar que AChE se expresa altamente en el hipotálamo, se quiso saber en qué núcleos específicamente se expresa este gen, por medio del Allen Brain Atlas. En la Figura 4, se muestra una alta expresión del gen *ACHE* (puntos rojos) en el núcleo paraventricular (PVN) y en el núcleo arqueado (NAc) del hipotálamo, los cuales están implicados en el apetito, la ingesta y la saciedad de alimentos.

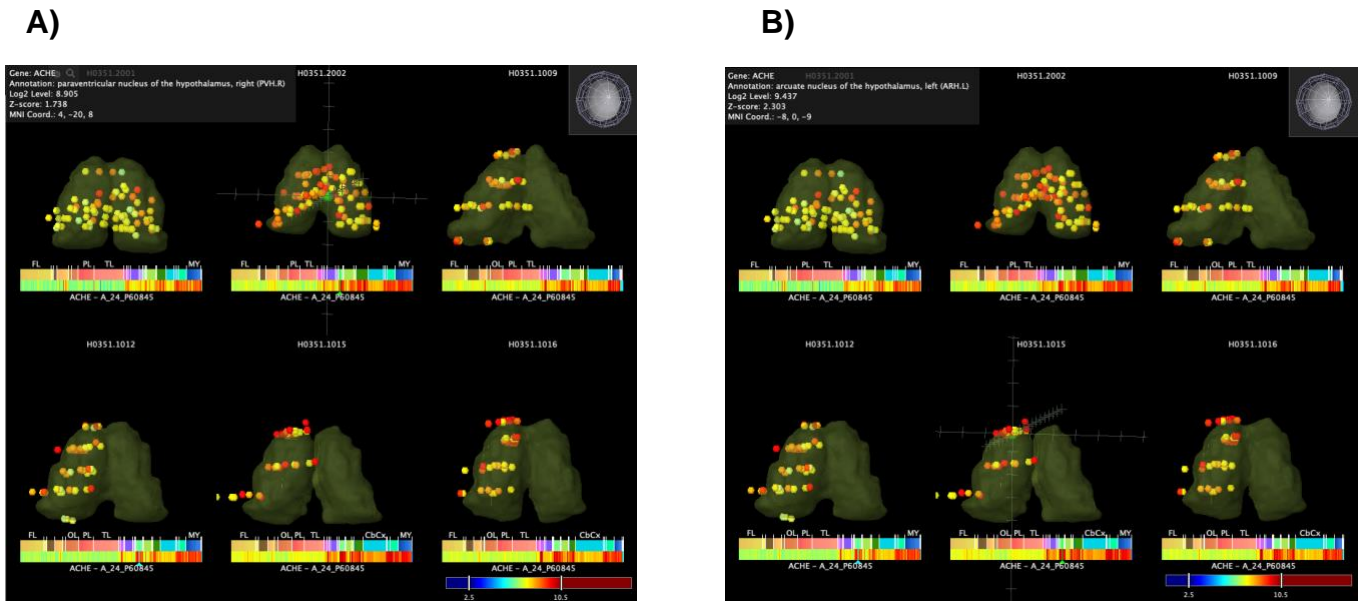


Figura 4: Expresión de *ACHE* en los núcleos paraventricular y arqueado del hipotálamo humano. A) Expresión de *ACHE* en el núcleo paraventricular (PVN) de seis donadores diferentes. **B)** Expresión de *ACHE* en el núcleo arqueado (NAc) de seis donadores diferentes. La expresión está dada en escala log2, un color más rojo significa más expresión. Foto tomada del Allen Brain Atlas.

Selección del medicamento inhibidor de la AChE

Una vez sabiendo que AChE se expresa en el hipotálamo y que los medicamentos dirigidos contra esta enzima cruzan la BHE, lo siguiente era decidir el medicamento a utilizar para este estudio.

Para esto, se revisó el tratamiento que provocaba un mayor porcentaje de disminución de peso en los pacientes. Se ha reportado que no existe una superioridad en términos de eficacia entre la galantamina, rivastigmina y donepecilo, (Birks, 2006). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que la galantamina tiene el porcentaje más alto de pacientes que presentaron pérdida de peso y disminución de ingesta (4.32% y 0.70%, respectivamente), comparado contra rivastigmina (2.34% y 0.82%, respectivamente) y donepecilo (2.01% y 0.42%, respectivamente, Tsoi et al.,

2019). Por lo que se decidió trabajar con galantamina y los otros dos medicamentos se descartaron de nuestro estudio.

Galantamina

La galantamina es un medicamento que se consume de forma oral, normalmente en presentación de cápsulas, en un rango de 8 - 24 mg una o dos veces por día (Kalola & Nguyen, 2002). Se ha descrito que los alimentos no tienen efecto sobre la relación concentración-tiempo ni sobre la vida media de eliminación (Lilienfeld, 2002), tampoco influye en la biodisponibilidad (Huang & Fu, 2010).

La galantamina tiene una biodisponibilidad, es decir la cantidad y el tiempo con el que el principio activo alcanza la circulación sistémica, de un 90 - 100% después de su consumo. Cuenta con una vida media (tiempo en que tarda la concentración en disminuir a la mitad de su valor inicial) de alrededor de 7 a 8 horas. Además, el tiempo necesario para llegar a su concentración máxima (T_{max}) es de 1 – 2 horas (Farlow, 2003; Razay & Wilcock, 2008). Por lo que tiene una absorción y logra una concentración en plasma rápida, junto con alta biodisponibilidad y baja unión a proteínas plasmáticas (18%).

Se metaboliza por medio de isoenzimas del citocromo P450 (CYP) en el hígado. Diferentes metabolitos han sido descritos, pero ninguno con un efecto terapéutico importante (Lilienfeld, 2002). Su excreción es un 95% en orina y un 5% en heces (Huang & Fu, 2010).

Planteamiento del problema

La EA es la causa más común de demencia y pérdida de memoria en gente mayor a 60 años (60 - 70% según la Organización Mundial de la Salud). Un medicamento utilizado para tratar esta enfermedad es la galantamina, la cual es un inhibidor de la enzima AChE.

La galantamina tiene frecuentes efectos secundarios como náuseas, vómito, mareos, dolor de cabeza y diarrea; mientras que algunos pacientes presentan anorexia. Se ha reportado que los pacientes que consumen este medicamento tienen una pérdida de peso importante. Por otra parte, observamos que la expresión del transcrito y de la proteína AChE se encuentran presentes en el hipotálamo.

Las neuronas hipotalámicas juegan un rol importante en la balanza energética por medio de *POMC* y *CART*, como genes anorexigénicos; *NPY* y *AgRP* como orexigénicos, y *MC4R* que sólo codifica para el receptor.

Con lo anterior, se podría pensar que la galantamina, medicamento utilizado en la EA que se encarga de bloquear la AChE y que, a veces, reduce el peso corporal, por lo que podría regular la expresión de genes de la balanza energética, probablemente aumentando la expresión de los péptidos anorexigénicos y disminuyendo la expresión de los orexigénicos.

Hipótesis

El fármaco galantamina, el cual es un inhibidor de la acetilcolinesterasa, aumenta la transcripción de genes hipotalámicos anorexigénicos y de receptor (*POMC*, *CART* y *MC4R*) y disminuye los orexigénicos (*NPY* y *AgRP*) en la línea celular IVB hipotalámica de rata.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el efecto de la galantamina sobre la expresión de los genes reguladores de la balanza energética (anorexigénicos: *POMC* y *CART*; orexigénicos: *AgRP* y *NPY*; y el receptor *MC4R*) en la línea celular IVB hipotalámica de rata.

Objetivos específicos

1. Cultivar las células IVB hipotalámicas de rata.
2. Optimizar las condiciones para la reacción de qPCR para medir los transcritos de *POMC*, *CART*, *AgRP*, *NPY* y *MC4R*, implicados en la balanza energética.
3. Tratar las células con diferentes concentraciones de glucosa, galantamina y tiempo de exposición.
4. Medir y analizar los transcritos *POMC*, *CART*, *AgRP*, *NPY* y *MC4R* en presencia del medicamento y de glucosa, a diferentes concentraciones.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se utilizaron las células de la línea IVB hipotalámicas entre los pases 26 - 31. Este cultivo celular se obtuvo del cerebro de embriones de ratas Spargue-Dawley, del día embrionario 19 (E19; Kasckow et al., 2003). El cultivo celular se mantuvo en medio de crecimiento DMEM (HyClone®) alto en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U de penicilina y 100 µg de estreptomicina/mL (Kageyama et al., 2009; Liu et al., 2006). El cultivo se mantuvo a 37°C, 5% de CO₂, 95% de humedad relativa. Los pases se realizaron cada 4-5 días cuando las células se encontraban a una confluencia del 80%.

Conteo celular

Los cultivos celulares utilizados se mantuvieron en el rango de 70 - 80% de confluencia. Se aspira el medio y después, se realiza un lavado con 2 mL de amortiguador de pH de fosfatos salino (PBS). Se aspira nuevamente y se agrega 1 mL de tripsina 0.25% con rojo fenol (HyClone®) para cajas de Petri (P100) o 0.5 mL para placas de 6 pozos, durante 1 minuto a 37°C. Con la punta de una micropipeta, se despegan las células mecánicamente. Posteriormente, se adiciona 1 mL de PBS para recuperarlo en un tubo Falcon estéril. Se centrifuga a 2000 rpm durante 3 minutos. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el botón celular con 1 mL de medio.

La muestra celular para el conteo se prepara en PBS con una dilución 1:10. Se cargan 10 µL en la cámara de Neubauer (MARIENFELD®). Se observa en el microscopio

y se hace un conteo de tres cuadrantes. Se calcula el número de células utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Células}}{\mu\text{L}} = \frac{\Sigma \text{ células contadas}}{(\# \text{ de cuadrantes})(0.1 \text{ mm grosor})(\text{dulción } 1:10)}$$

Se utilizaron cajas de 6 pozos estériles para los plaqueos celulares. Después del conteo celular, se calculan los microlitros necesarios para tener alrededor de 1,350,000 células por pozo en un volumen final de 2 mL por pozo. Se dejan incubar las placas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Preparación del medicamento para cultivo celular

El medicamento utilizado fue el Langyiril OD* (Sun Pharma®), bromhidrato de galantamina, en cápsulas de 8 mg de liberación prolongada. Para poder disolver el medicamento, se utilizaron 8.76 mL de agua bidestilada y se ajustó el pH utilizando ácido clorhídrico (HCl), pues la galantamina se disuelve en un pH = 6. El total del volumen fueron 9.26 mL con una sola pastilla de 8 mg y una concentración final de 3 mM (stock). A partir del stock se probaron 5 concentraciones diferentes (0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM y 0.15 mM; Thomsen et al., 1991) para obtener la concentración óptima.

Tratamiento de células

Para el tratamiento de las células, primero se observó que todos los pozos tuvieran una confluencia celular del 80%. Los diferentes tratamientos se explican en cada experimento, entre los cuales se encuentran: sin o con medicamento (0.1 mM), en privación de glucosa (0 mM), con dos diferentes concentraciones de glucosa (4.5 mM u 11 mM de glucosa) o medio completo (25 mM de glucosa).

Para la privación de glucosa, a cada pozo se le retiraron los 2 mL de medio y se les agregó 1 mL de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) por 1 hora. Pasado ese tiempo, se inició la estimulación con glucosa a diferentes concentraciones (4.5 mM y 11 mM) agregando o no la galantamina (0.1 mM) por 2 horas, con un volumen final de 1 mL por pozo. Las placas se dejaron incubar a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa durante los tiempos de tratamiento.

Extracción del RNA

El RNA se extrajo de las células IVB hipotalámicas de rata utilizando el kit de extracción Total RNA Purification Kit (Jena Bioscience®). Posterior a la estimulación con medicamento y glucosa, a las células se les agrega el amortiguador de lisis que contiene β-mercaptoetanol (2-ME), el cual funge como agente reductor de enlaces disulfuro y desnaturizante de ribonucleasas. Se pipetea fuertemente para desprender las células de la caja Petri. Posteriormente, las células se pasan a un tubo Eppendorf y se agregan 350 μL de isopropanol 99.5% puro (Sigma-Aldrich®) y se mezcla por pipeteo o vórtex.

Por otro lado, a la columna de purificación se le adicionan 100 μL de amortiguador de activación, logrando que se hidrate la sílica de la columna y dándole la polaridad

positiva, para así retener al RNA (con carga negativa) en ella. Después, se centrifuga a 10,000 g por 30 segundos.

La mezcla de las células lisadas con isopropanol se coloca en la columna de purificación recién activada y se centrifuga a 10,000 g por 30 segundos. Se hace un primer lavado de 700 μ L con la solución de lavado primario y se centrifuga a 10,000 g por 30 segundos. Se desecha el eluido, se adicionan 700 μ L de la segunda solución de lavado a la columna y se centrifuga de la misma manera otra vez.

Finalmente, se centrifuga a 10,000 g por 2 minutos para eliminar residuos. Se coloca la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo y se le añaden 30 μ L de agua libre de RNAsas tibia, dejando incubar por 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifuga por 1 minuto para obtener el eluido, el cual contiene al RNA.

Cuantificación del RNA por espectrofotometría

La cantidad y pureza del RNA extraído se determina mediante espectrofotometría. El RNA obtenido se cuantifica tomando 1.5 μ L de muestra y colocándola en la placa NanoDrop (Thermo Fisher®). Con ayuda del espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan Go®), se obtiene la relación de las absorbancias (pureza) y concentración (ng/ μ L). Esta medición se realiza en el rango del espectro UV, con lecturas a una $\lambda=260$ y 280 nm. La pureza se calcula con la relación A_{260}/A_{280} ; si es menor a 1.8, se considera que la muestra está contaminada con material proteico. Si es mayor a 1.8, se considera una muestra pura de RNA. Por otro lado, si la concentración de RNA es menor a 100

ng/ μ L, no se considera viable de utilizar para los siguientes experimentos (Cseke et al., 2011)

Síntesis de cDNA por reacción de transcriptasa reversa (RT)

La reacción de transcriptasa reversa (RT) es aquella que, a partir del ácido ribonucleico mensajero (mRNA), se obtiene el DNA complementario (cDNA). Este procedimiento se realizó de acuerdo con el protocolo del kit de síntesis de cDNA (Jena Bioscience®) para reacciones con volumen final de 20 μ L y a partir de 1000 ng de RNA.

Reactivos para la reacción de RT:

Reactivo	1X Volumen (μL)	Concentración final
Amortiguador completo para la Script RT	0.5	1x
Mix de dNTPs	1.0	500 μ M c/u
Ditiotreitol (DTT)	1.0	5mM
Oligos dT	0.5	300 ng
Inhibidor de RNAsas	1.0	20 U
Transcriptasa reversa Script	0.5	100 U
Agua libre de RNAasas	cbp 20 μ L	-
RNA 1000 ng	cbp	-

Todas las reacciones necesarias se incuban en un termociclador (Axygen Maxygene II, PCR convencional), y se utilizan las siguientes condiciones para el termociclador:

Temperatura	Tiempo (min)
42°C	10
50°C	60
70°C	10

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que se utiliza para amplificar u obtener muchas copias de un gen o una región específica del DNA. En la PCR en tiempo real (qPCR), la cantidad de amplicones es detectada y cuantificada a medida que transcurre la reacción. Con esta técnica es posible detectar la cantidad del transcrito de un gen en específico que hay en una muestra.

Se requieren sondas TaqMan, las cuales se hibridan específicamente a la secuencia del gen objetivo. Las sondas son oligonucleótidos que llevan un fluoróforo reportero en el extremo 3' y un fluoróforo amortiguador en el extremo 5' ("quencher") que se encarga de bloquear la emisión de fluorescencia. En el momento que la Taq polimerasa se encuentra con la sonda, se hidroliza (por su actividad 5'-3'), logrando la emisión de fluorescencia. Por lo tanto, en cada ciclo existe fluorescencia que se puede cuantificar. Es por eso que la emisión de fluorescencia se relaciona con la cantidad de mRNA (Cseke et al., 2011) Además, se requiere también: la Taq polimerasa, primers, dNTPs, magnesio, amortiguador y agua, las cuales ya se encuentran en la mezcla de la reacción proporcionadas en el estuche de qPCR.

Para la amplificación, se utilizó la mezcla Fast qPCR Probes Master High ROX (Jena Bioscience®) y las sondas para los siguientes genes: *RPL32* (Rn00820748), *AgRP*

(Rn01431703), *NPY* (Rn01410145), *CART* (Rn1645174), *MC4R* (Rn7311184) y *POMC* (Rn00595020). Dichas sondas fueron anteriormente utilizadas por nuestro equipo de trabajo en el hipotálamo de ratas (Grayson et al., 2013). Todos los reactivos y cantidades para una reacción se resumen en la tabla:

Reactivo	1X Volumen (µL)
Mezcla Fast qPCR Probes Master High ROX Jena Bioscience®	5.0
Agua libre de RNAsas/DNAsas	3.5
Sonda para gen específico	0.5 (concentrado o diluido, dependiendo del gen)
Muestra (cDNA)	1.0 o 2.0 (dependiendo del gen)

Análisis de qPCR: Doble Delta Ct

El *cycle threshold* (CT) es el número de ciclos en el que la señal fluorescente cruza el umbral e indica el momento preciso de la amplificación en el que se identifica la presencia del gen diana (Serrano-Cumplido et al., 2021).

El análisis Doble Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$), es un método de cuantificación relativa que utiliza la información del Ct para calcular la expresión génica entre las muestras objetivo y de referencia. Para esto, se utiliza un gen de referencia como normalizador, es decir, un gen que se mantiene estable ante cualquier tratamiento y no es objetivo de estudio. En este caso, se utilizó al gen *RPL32*, el cual codifica para la proteína ribosomal *L32*. Dicho método supone que la eficiencia de amplificación es del 100%, es decir, que se asume que la PCR dobla exactamente la cantidad de material dentro de la muestra.

El primer ΔCT , se obtiene del resultado de la siguiente resta entre los genes:

$$\Delta CT = CT(\text{gen objetivo}) - CT(\text{gen referencia})$$

El segundo delta ($\Delta\Delta CT$), se obtiene calculando la diferencia de los ΔCT entre las muestras del experimento y las muestras control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{muestra objetivo}) - \Delta CT(\text{muestra control})$$

El resultado se muestra como una razón de cambio entre las dos muestras. Posteriormente, se realiza la operación de $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde el 2 denota la eficiencia de la amplificación de la PCR (Rao et al., 2013).

Análisis estadístico

Los resultados de la qPCR se analizaron en Excel y posteriormente, se pasaron a GraphPad Prism para realizar los estadísticos y graficarlos. Se utilizó el estadístico ANOVA de dos vías (two-way ANOVA), la cual se emplea cuando existen más de dos grupos, como, por ejemplo: con y sin galantamina, y, además, en más de una condición (privación de glucosa, 4.5 mM y 11 mM de glucosa). Como *post-test* se utilizó Tukey.

Resultados

Optimización de la curva de proliferación celular a densidades crecientes

Se realizó la optimización del número de células y del tiempo de plaqueo necesario para obtener una placa de 6 pozos con confluencia celular del 80%. La confluencia se determinó mediante observación al microscopio. El número de células por pozo que se plaqueó fue desde 250,000 hasta 1,500,000 células/pozo y se tomaron fotos a las 24, 48, 72 y 96 horas (Figura 5). Se puede observar que, a las 24 horas, se perciben más células conforme aumenta la concentración, siendo aproximadamente un 70% de confluencia para las condiciones de 12.5×10^5 o 15×10^5 células. A las 48 horas, esas mismas dos condiciones ya tenían una confluencia del 80%. Pasando las 72 horas, desde el pozo con 7.5×10^5 células en adelante, se notaba del 80% al 100% de confluencia. A las 96 horas, todos los pozos, menos el de menor cantidad, contaban con más del 80% de confluencia.

Con estos resultados, se eligió la cantidad óptima para lograr una confluencia del 80% a las 24 horas. Se tomó la media entre 12.5×10^5 y 15×10^5 células por pozo, es decir, 13.5×10^5 células por pozo para los siguientes experimentos.

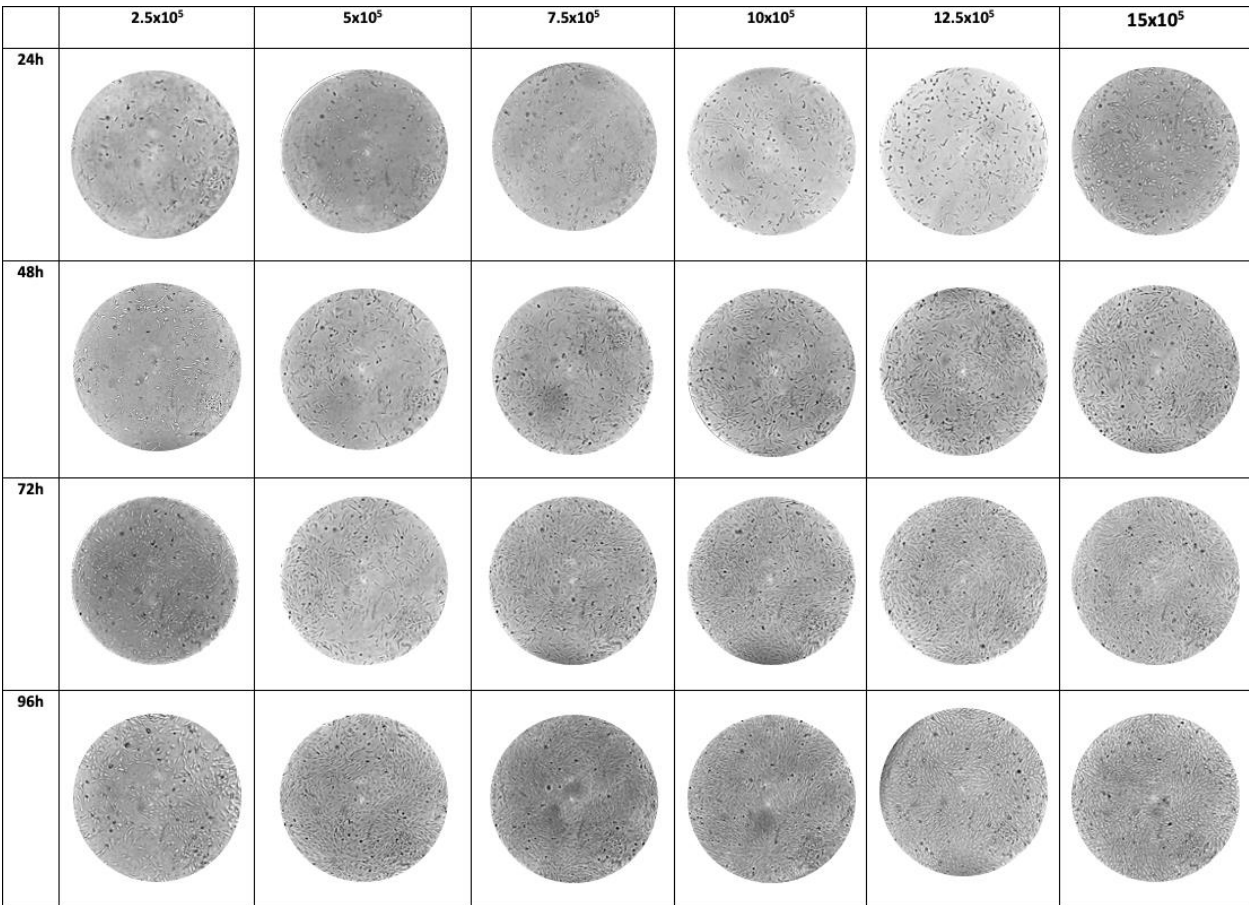


Figura 5: Curva de proliferación celular a densidades crecientes. En cada pozo se plaqueó diferente cantidad de células por pozo (250,000; 500,000; 750,000; 1,000,000; 1,250,000 y 1,500,000) y se fotografiaron cada 24 h hasta 96 (24 h, 48 h, 72 h y 96 h; $n = 1$).

Optimización de las sondas Taqman

Se optimizaron las sondas Taqman para cada gen que se deseaba estudiar: *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R*, *POMC* y *L32* (gen control), ya que era la primera vez que se utilizaban las sondas específicas para estos genes en la línea celular IVB hipotalámica de rata.

Primero, se extrajo RNA utilizando el kit Jena Bioscience®, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. La concentración de RNA extraído fue en promedio de 250

ng/ μ L por muestra. Posteriormente, se hizo una reacción de transcriptasa reversa, lo que generó cDNA, el cual es necesario para la qPCR.

Para la optimización, se probaron diferentes concentraciones de cada sonda y diluciones de cDNA para cada gen. Por ejemplo, se utilizó la sonda diluida (1:5) y la sonda concentrada y diferentes volúmenes de cDNA (1 μ l diluido 1:5, 1 μ l concentrado y 2 μ l concentrado).

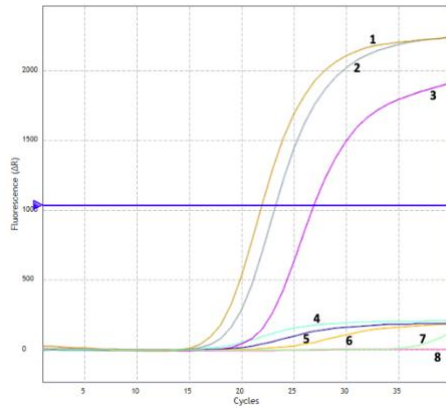
En la Figura 6 (A – E) y Tabla 1, se observa que, para los genes *L32*, *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R*, la fluorescencia es mayor con la sonda concentrada (números 1, 2 y 3), que con la sonda diluida (números 4, 5 y 6). También, se muestra que los controles negativos (números 7 y 8), los cuales no contienen cDNA, no amplifican señal. Interesantemente, para el gen *POMC* (Figura 6F), no se obtuvieron resultados en ninguna condición, por lo que se decidió no continuar con su medición. Por otra parte, al aumentar la concentración de cDNA, el CT disminuye, como era de esperarse y se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de CTs para las sondas de *L32*, *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R* y *POMC* a diferentes concentraciones de sonda y cDNA.

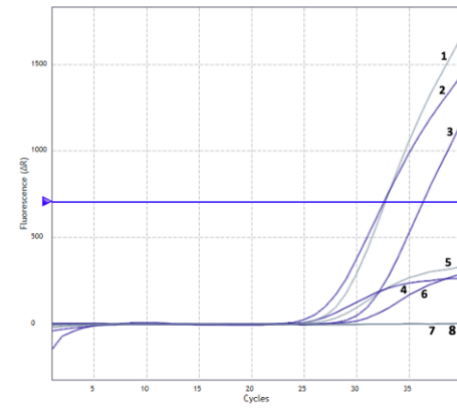
1) Sonda concentrada + 1 µl cDNA diluido 1:5. **2)** Sonda concentrada + 1 µl cDNA concentrado. **3)** Sonda concentrada + 2 µl cDNA concentrado. **4)** Sonda diluida 1:5 + 1 µl cDNA diluida 1:5. **5)** Sonda diluida 1:5 + 1 µl cDNA concentrado. **6)** Sonda diluida 1:5 + 2 µl cDNA concentrado. **7)** Sonda concentrada sin cDNA. **8)** Sonda diluida 1:5 sin cDNA.

Gen	Condición sonda concentrada	CT	Condición sonda diluida 1:5	CT	Control negativo	CT
<i>L32</i>	1	26.16	4	29.22	7	No detectado
	2	22.69	5	24.83	8	No detectado
	3	21.4	6	21.99		
<i>AgRP</i>	1	36.56	4	34.1	7	No detectado
	2	32.92	5	30.95	8	No detectado
	3	32.94	6	30.25		
<i>NPY</i>	1	39.03	4	No detectado	7	No detectado
	2	No detectado	5	No detectado	8	No detectado
	3	37.99	6	No detectado		
<i>CART</i>	1	40.51	4	40.11	7	No detectado
	2	37.51	5	47.19	8	No detectado
	3	36.21	6	No detectado		
<i>MC4R</i>	1	38.74	4	36.35	7	No detectado
	2	35.48	5	34.41	8	No detectado
	3	34.25	6	32.96		
<i>POMC</i>	1	No detectado	4	No detectado	7	No detectado
	2	No detectado	5	No detectado	8	No detectado
	3	No detectado	6	No detectado		

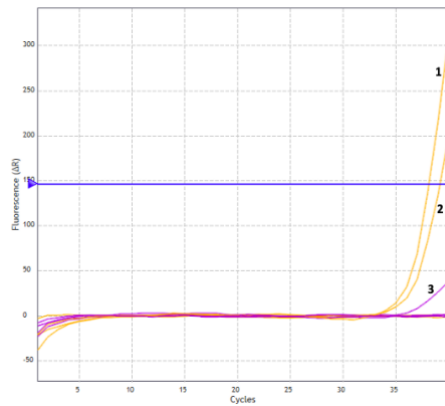
A) *L32*



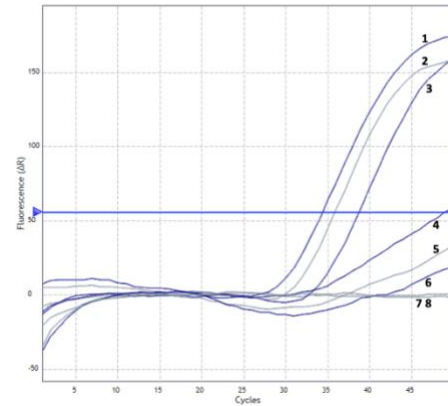
B) *AgRP*



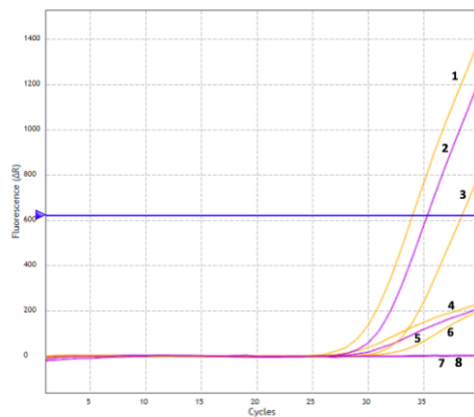
C) *NPY*



D) *CART*



E) *MC4R*



F) *POMC*

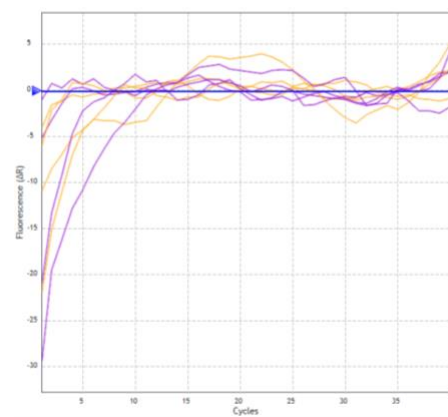


Figura 6: Curvas de amplificación de los genes *L32*, *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R* y *POMC* a diferentes concentraciones de cDNA y de sonda. 1) Sonda concentrada + 1 μ l cDNA diluída 1:5. 2) Sonda concentrada + 1 μ l cDNA concentrado. 3) Sonda concentrada + 2 μ l cDNA concentrado. 4) Sonda diluída 1:5 + 1 μ l cDNA diluída 1:5. 5) Sonda diluída 1:5 + 1 μ l cDNA concentrado. 6) Sonda diluída 1:5 + 2 μ l cDNA concentrado. 7) Sonda concentrada sin cDNA. 8) Sonda diluída 1:5 sin cDNA ($n = 1$).

Basado en estos resultados, para cada gen se obtuvo la condición óptima, las cuales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones óptimas de concentración de sonda y de cDNA para la cuantificación del transcrito de cada gen (*L32*, *NPY*, *AgRP*, *MC4R*, *CART* y *POMC*) por medio de qPCR.

Gen	Sonda	cDNA concentrado (μl y ng finales)
<i>L32</i>	Sonda diluida (1:5, 0.20 x)	1 μ l [50 ng]
<i>NPY</i>	Sonda concentrada (1 x)	2 μ l [100 ng]
<i>AgRP</i>	Sonda diluida (1:5, 0.20 x)	1 μ l [50 ng]
<i>MC4R</i>	Sonda diluida (1:5, 0.20 x)	1 μ l [50 ng]
<i>CART</i>	Sonda concentrada (1 x)	1 μ l [50 ng]
<i>POMC</i>	No se obtuvieron resultados	2 μ l [100 ng]

Al comparar la expresión de los genes en medio completo y en condiciones basales, se notó que *AgRP* fue el gen con mayor expresión. *MC4R* y *CART* fueron los siguientes genes con mayor expresión, mientras *NPY* mostró muy poca expresión. Desafortunadamente, para *POMC* no hubo expresión, por lo que no se continuó con su medición (Figura 7). Se podría pensar que esto se debe a un problema con la sonda de amplificación; sin embargo, para la amplificación de los genes *AgRP*, *NPY* y *POMC*, se utilizaron las mismas sondas que nuestro grupo de trabajo había reportado anteriormente en tejido hipotalámico de rata postnatal (día 22) y mostraron expresión (Grayson et al., 2013).

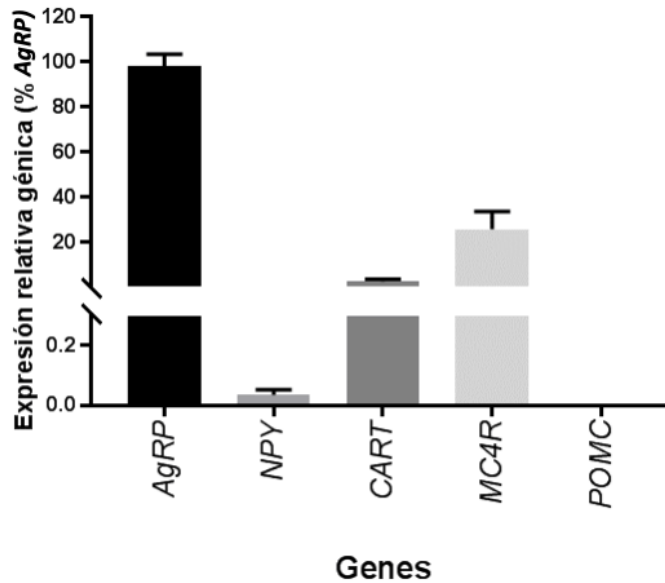


Figura 7: Expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART*, *MC4R* y *POMC* en medio completo sin tratamiento en las células IVB hipotalámicas de rata.

Expresión de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* en la optimización de condiciones de privación de glucosa o diferentes concentraciones de glucosa a diversos tiempos

Una vez sabiendo que los genes de interés se encuentran expresados en la línea celular IVB (excepto *POMC*), se evaluó la expresión de los genes anorexigénicos y orexigénicos en condiciones que se pudieran modificar, como son la privación de glucosa y diferentes concentraciones de glucosa.

Anteriormente, se había reportado que la concentración de 10-11 mM de glucosa inhibía a neuronas anorexigénicas (Ma et al., 2008). El medio de cultivo en el que se crecen las células IVB contiene 4500 mg/L de glucosa (equivalente a 25 mM). Por lo

tanto, se realizó la privación de glucosa de una hora a las células y luego se estimularon con concentraciones de 4.5 mM y 11 mM de glucosa para ver la expresión génica.

Anteriormente, se observó que las células morían al dejarlas incubando por 2 horas o más en solución HBSS, es por esto que, se decidió hacer una privación de glucosa de 1 hora solamente. Posteriormente, se agregaron las diferentes concentraciones de glucosa (4.5 mM u 11 mM) al HBSS, dejándose incubar por 1 o 2 horas, resultados que se muestran en la Figura 9.

El gen *AgRP* presentó una mayor expresión en el medio completo (167.77%), comparando contra el tratamiento de privación de glucosa (100%); además, se redujo la expresión al tratar con 4.5 mM de glucosa en una hora (64.80%) y aumentó en 11 mM (107.86%); mientras que, en dos horas, la expresión fue similar en ambas concentraciones de glucosa (102.80% para 4.5 mM y 97.03% para 11 mM).

Para el gen *NPY*, su expresión en el tratamiento con medio fue de 22.60%, en la privación de glucosa fue de 100%; para el tratamiento de 4.5 mM de glucosa una hora fue de 36.83%, mientras que para 11 mM no se obtuvieron resultados, posiblemente por un error al momento de hacer la reacción. Por otro lado, a las 2 horas con 4.5 mM y 11 mM de glucosa, la expresión disminuyó (14.40% y 46.08%, respectivamente) comparado con la privación de glucosa.

Para el gen *CART*, la expresión aumentó en medio (131.87%) comparado con la privación de glucosa (100%). Además, es menor en 4.5 mM de glucosa a una hora (69.64%) y en 11 mM de glucosa a una hora (89.77%). El tratamiento de dos horas con

4.5 mM de glucosa fue del 91.77% y para 11 mM de glucosa, la expresión disminuyó (65.98%).

Por último, *MC4R* mostró muy poca diferencia entre el medio (93.44%) y la privación de glucosa (100%). Además, en 1 hora de exposición, a 4.5 mM y 11 mM de glucosa, la expresión disminuyó (68.09% y 79.77%, respectivamente), comparado con privación de glucosa. Finalmente, 4.5 mM de glucosa en dos horas casi no obtuvo cambios (99.29%), mientras que 11 mM disminuyó (67.08%), comparado con la privación de glucosa.

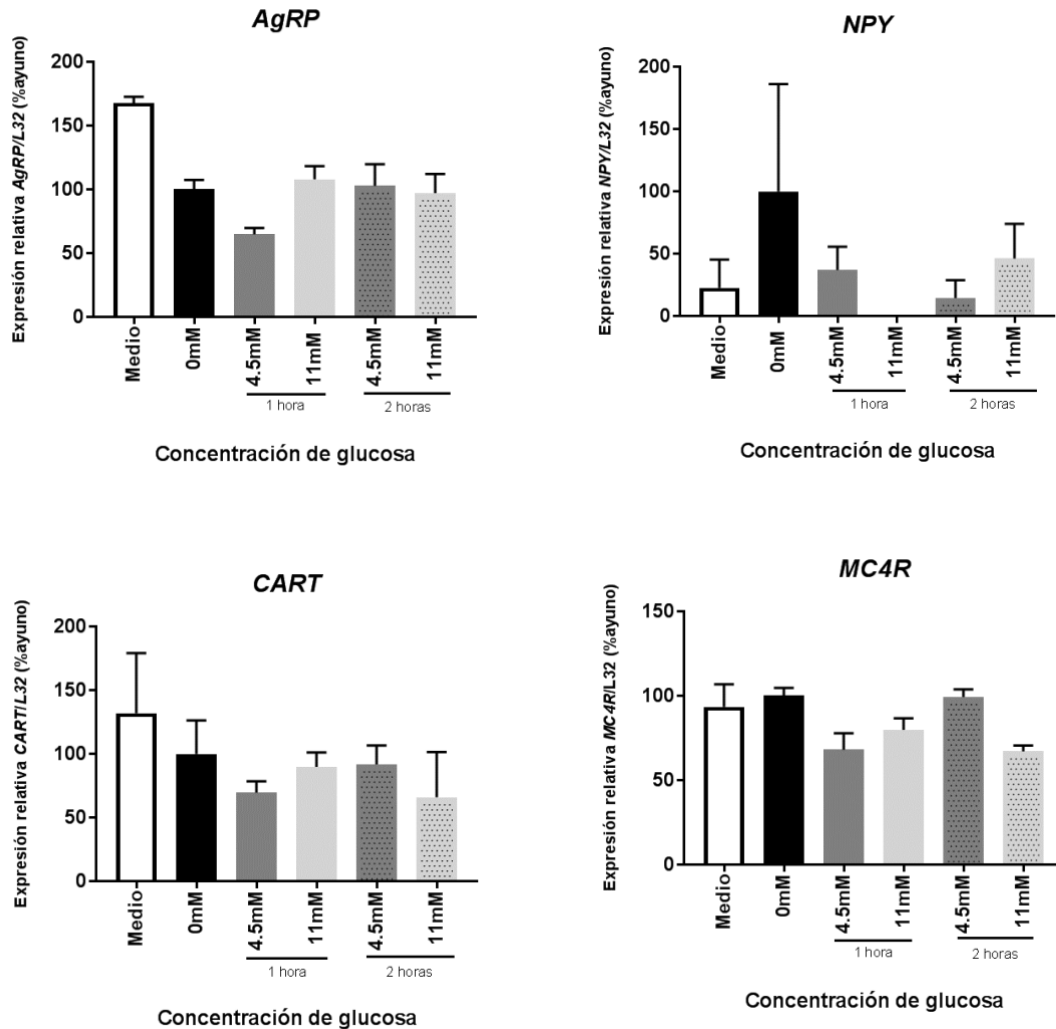


Figura 8: Porcentaje de expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* al optimizar privación de glucosa y diferentes concentraciones de glucosa a diversos tiempos. Se muestran los genes orexigénicos (*AgRP* y *NPY*), anorexigénico (*CART*) y de receptor (*MC4R*) en medio completo, privación de glucosa (0 mM), 4.5 mM y 11 mM de glucosa a una y 2 horas de exposición, ($n = 1$).

Observando los resultados de la Figura 8, se decidió utilizar 1 hora de privación de glucosa y 2 horas de exposición al tratamiento de glucosa (4.5 mM u 11 mM), ya que observamos que los genes *AgRP*, *CART* y *MC4R* presentan una buena expresión a estas condiciones. Además, se sugiere que la galantamina se ingiera después de los alimentos, lo que se pudiera simular con las diferentes concentraciones de glucosa.

Expresión de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* en la optimización de diferentes concentraciones de galantamina

Anteriormente, se reportó que una dosis de 0.1 mM de galantamina provocó la mayor inhibición de su blanco, la enzima AChE, en rebanadas de hipocampo y corteza frontal estimuladas *in vitro* (Thomsen et al., 1991). Con base en este reporte, se decidió probar diferentes concentraciones de galantamina en el cultivo celular de IVB: 0.005 mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM y 0.15 mM de galantamina.

En la Figura 9, se presenta la expresión de los genes *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* a diferentes concentraciones de galantamina y se comparan con la privación de glucosa. Para el gen *AgRP*, se observó que a mayor concentración de medicamento existe dosis-respuesta (donde 0.005 mM es 100% y aumenta hasta 323.77% en 0.15 mM). Para *NPY*, no se obtuvieron resultados para 0.005 mM ni 0.05 mM de galantamina, posiblemente debido a un problema técnico del termociclador; sin embargo, la expresión es mayor en una concentración de 0.01 mM (100%), comparado con las concentraciones 0.1 y 0.15 (54.46% y 67.87%, respectivamente). *CART* disminuyó su expresión en 0.01 mM (46.25%) y 0.15 mM (42.97%) de galantamina, comparado con 0.005 mM (100%). Además, aumentó su expresión en las concentraciones 0.05 mM (409.132%) y 0.1 mM (283.41%) de medicamento, formando así una respuesta de “U” invertida. Finalmente, *MC4R* también tuvo una respuesta de “U” invertida, siendo las más altas 0.01 mM (185.07%), 0.05 mM (288.69%), 0.1 mM (282.94%) y 0.15 mM (112.41%) en comparación con 0.005 mM (100%).

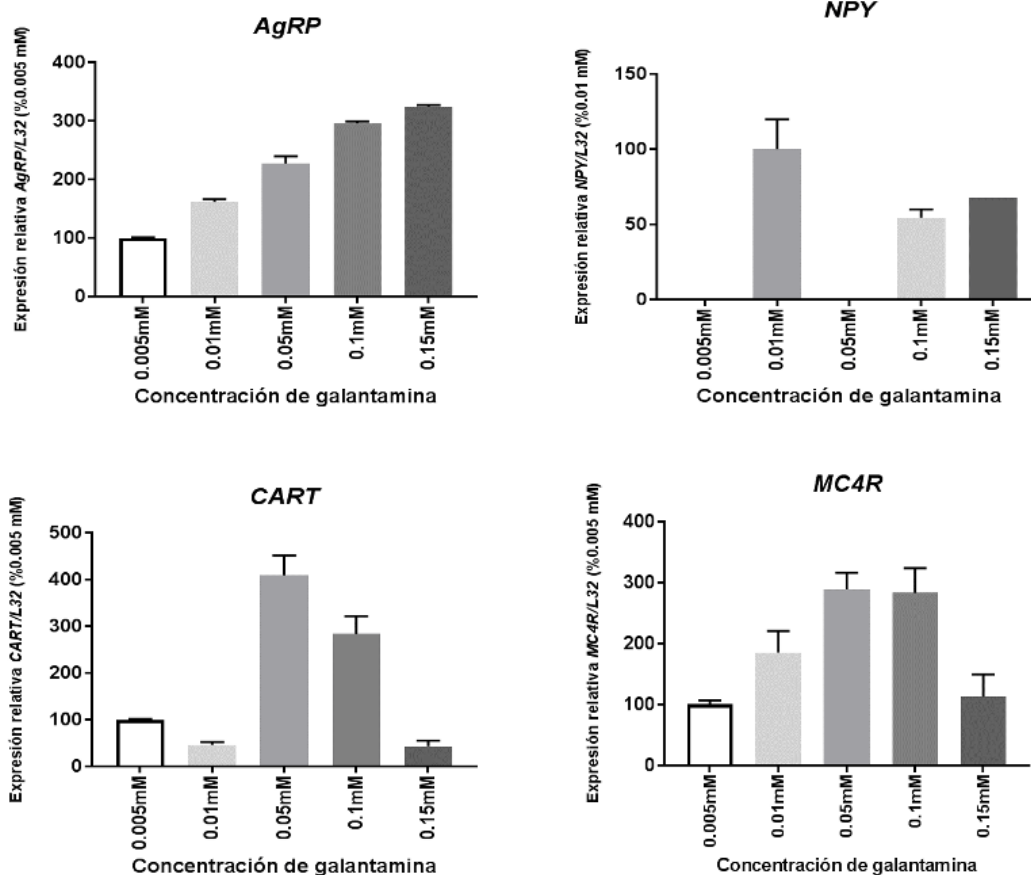


Figura 9: Porcentaje de expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* al optimizar con diferentes concentraciones de galantamina. Expresión de los genes orexigénicos (*AgRP* y *NPY*), anorexigénico (*CART*) y de receptor (*MC4R*) en concentraciones de 0.005mM, 0.01 mM, 0.05 mM, 0.1 mM y 0.15 mM de galantamina y con una exposición de 2 horas del mismo, ($n = 1$).

Por lo tanto, a partir de las optimizaciones, se eligió la concentración 0.1 mM de galantamina, ayunando a las células por 1 hora y estimulando posteriormente con el medicamento y/o glucosa por 2 horas.

Efecto de la galantamina sobre la expresión de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* en presencia de diferentes concentraciones de glucosa

Una vez optimizada la concentración y el tiempo de exposición de la galantamina, así como las concentraciones de glucosa, se realizaron los experimentos para evaluar el efecto de este medicamento sobre la expresión de los genes de la balanza energética (*AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R*).

Se plantearon los siguientes grupos: medio completo, privación de glucosa y privación de glucosa + glucosa (concentraciones de 4.5 mM y 11 mM) en presencia o ausencia de galantamina (Figura 10).

Para el gen *AgRP*, en el grupo control sin galantamina se observó una tendencia al aumento de la expresión conforme se incrementa la concentración de glucosa (110.94% para 4.5 mM y 135.54% para 11 mM), mientras que el medio disminuyó (97.53%), lo anterior con respecto a la privación de glucosa (100%). Por otra parte, en el grupo con medicamento, se observó una tendencia a la disminución de la expresión de *AgRP* en los tratamientos con privación de glucosa (49.10%) y privación de glucosa + 4.5 mM (90.88%), comparadas con el medio (122.53%). Además, se observó una disminución significativa entre el medio y la privación de glucosa + 11 mM (29.47%). Finalmente, entre los tratamientos de privación de glucosa + 11 mM de glucosa, se observó una diferencia significativa entre el grupo sin galantamina (135.54%) y el grupo con galantamina (29.47%).

Por otro lado, para el gen *NPY*, no se observaron diferencias significativas en la expresión en presencia o ausencia de medicamento. En el grupo sin galantamina se

observa un ligero aumento en la expresión entre los tratamientos con glucosa (127.50% para 4.5 mM y 118.19% para 11 mM) comparado con la privación de glucosa (100%) sin ser significativos, mientras que para el medio no se observa ninguna expresión. Por otro lado, en el grupo con galantamina, en medio el gen aumentó su expresión (281.25%) comparado con el grupo de privación de glucosa (100%) sin diferencia significativa. Desafortunadamente, no se obtuvieron resultados para los tratamientos con medicamento + 4.5 mM glucosa ni 11 mM de glucosa.

Para *CART*, no se registraron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos con o sin galantamina. Sin embargo, se nota una tendencia a la sobreexpresión en el grupo sin medicamento + 11 mM de glucosa (142.39%), comparado contra la privación de glucosa (100%). Por otra parte, para el grupo con galantamina, la expresión del medio (76.43%), de 4.5 mM (97.65%) y 11 mM (76.54%) de glucosa, es menor que la de privación de glucosa (100%).

Por último, para el gen *MC4R*, no se notaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos con o sin galantamina. Sin embargo, se observó que el tratamiento con medio (149.87%) es mayor que los otros tres tratamientos (100% para privación de glucosa, 117.31% para 4.5 mM y 126.76% para 11 mM), sin ser significativo. En cambio, para el grupo con galantamina, se observó que aumentó la expresión del gen en medio (122.43%) comparado con la privación de glucosa (100%), siendo significativo. Además, entre el medio y la privación de glucosa + 11 mM de glucosa (36.41%), también se notó una diferencia significativa. Finalmente, entre la privación de glucosa sin medicamento

(100%) y con medicamento (45.12%), y los tratamientos con 11 mM de glucosa en presencia (126.76%) o ausencia (36.41%) de galantamina, hubo significancia.

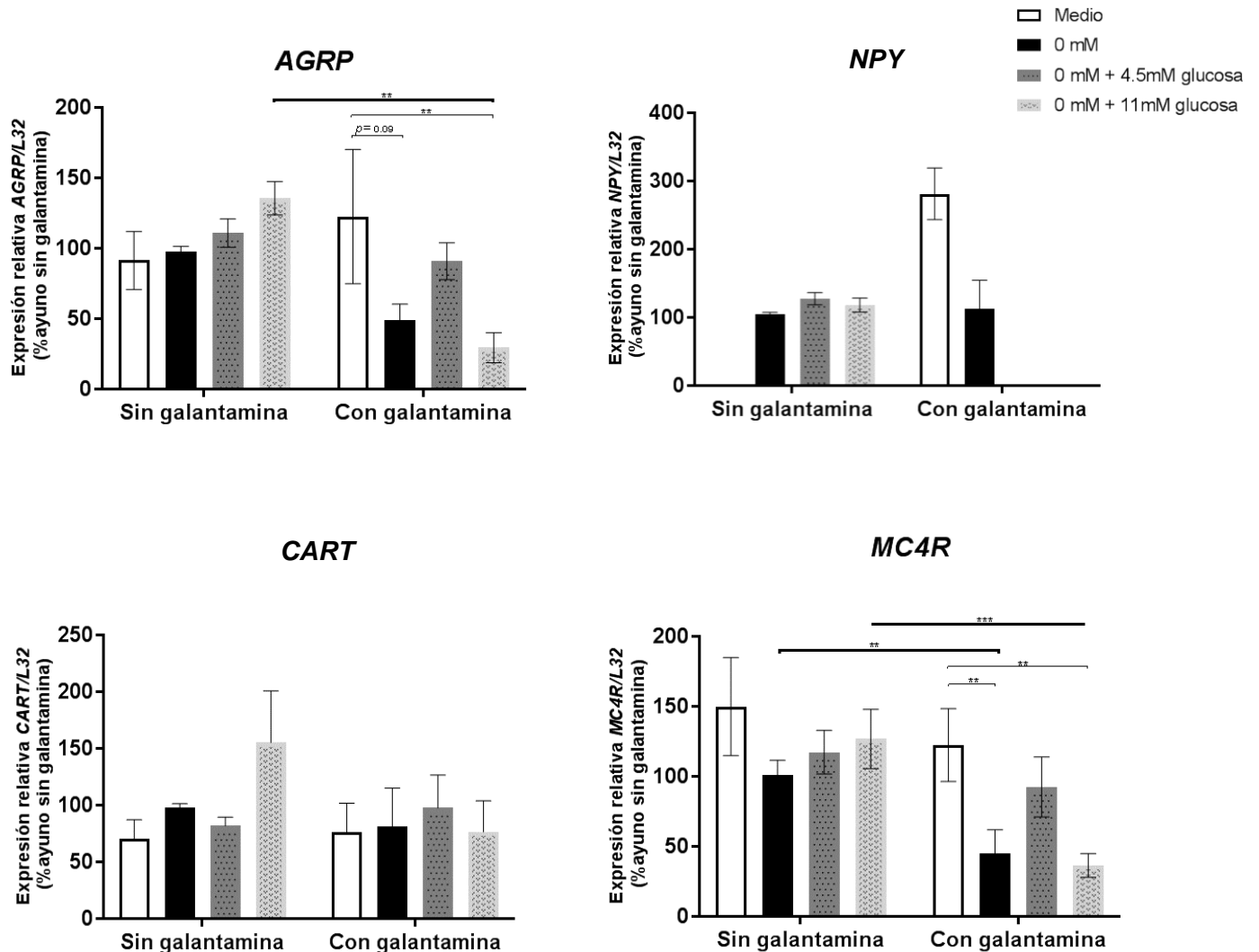


Figura 10: Expresión relativa de *AgRP*, *NPY*, *CART* y *MC4R* en presencia o ausencia de galantamina con estímulos de privación de glucosa y diferentes concentraciones de glucosa. Se muestran los genes orexigénicos (*AgRP* y *NPY*), anorexigénico (*CART*) y de receptor (*MC4R*) en privación de glucosa (0 mM), 4.5 mM y 11 mM de glucosa en presencia de una concentración de 0.1 mM de medicamento durante 2 horas de exposición. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA de dos vías, $p < 0.05$ ($n = 3$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Datos presentados con promedio \pm S.E.M.

Discusión

Anteriormente, se había reportado que los pacientes tratados con galantamina disminuyen su peso corporal (Matsunaga et al., 2019; Vercruysse et al., 2018). La galantamina es un medicamento que cruza la BHE; además, su blanco, la enzima AChE, se encuentra expresada en el hipotálamo. Es por esto que, en este proyecto se estudió si el medicamento regula la expresión de los genes implicados en la balanza energética: *AgRP* y *NPY* como genes orexigénicos; *CART* y *POMC* como genes anorexigénicos y *MC4R* que codifica para el receptor de *AgRP* y α -MSH.

Nuestro modelo de estudio fue la línea celular IVB hipotalámica de rata embrionaria del día 19 (E19), en la que no se había reportado previamente la expresión de los genes de la balanza energética. Por lo que, lo primero fue ver si estos genes se expresaban en esta línea celular (Figura 6 y Tabla 1). Se sabe que el CT <25, indica una excelente expresión del gen; mientras que CTs >30, significan menor expresión y CTs >38 casi nula (Bouزيد et al., 2021). En nuestros resultados se observó que los genes *AgRP* y *MC4R*, presentan CTs ~30, lo que significa que existe una expresión muy baja de estos genes. Por otra parte, para los genes *NPY* y *CART*, la expresión es casi nula, ya que los CTs se encuentran alrededor de 40, a pesar de que siempre se utilizaron 1000 ng de cDNA. Sin embargo, los resultados muestran que *AgRP* es el gen más expresado seguido de *MC4R*, *CART* y *NPY*, sin encontrar expresión de *POMC*, en esta línea celular IVB (E19). Esto coincide con lo reportado anteriormente en otra línea celular embrionaria mHypoE-29/1 (de ratón de 15-18 días; Belsham et al., 2004), donde se observó una buena expresión de *AgRP* y *MC4R* (Dalvi et al., 2021).

Por otra parte, se ha reportado que la expresión de *MC4R* es muy alta en el día E14 en ratas (Mountjoy & Wild, 1998), por lo que esto podría explicar la alta expresión de este gen en la línea celular IVB (E19) utilizada en este proyecto. Para el gen *NPY*, se ha descrito que a partir del día E14 se encuentra expresado este gen en el hipotálamo de rata y para el día E16 comienza a disminuir su expresión (Kagotani et al., 1989). Nuestros resultados demostraron poca expresión de este gen en la línea IVB, lo que sugiere que al ser una línea embrionaria E19, su expresión está reducida.

Para *CART*, se ha reportado que su expresión comienza a partir del día E11 en el mesencéfalo y para el día E16, el transcrito disminuye (Brischoux et al., 2002). Esto sugiere que la baja expresión de *CART* observada en la línea celular IVB E19, se deba a la disminución del transcrito para el día E19.

Por último, *POMC* no se logró amplificar bajo ninguna condición. El mRNA de este gen se encuentra expresado desde el día E10 en el hipotálamo ventral de ratón, pero tiene una reducción de expresión a partir del día E13 (Padilla et al., 2010). Por lo que es posible que en la línea celular IVB E19, este transcrito ya no se encuentre expresado en esa etapa embrionaria. Se puede descartar la posibilidad de un problema técnico de amplificación con la sonda (Rn00595020), ya que esta sonda ha sido anteriormente por nuestro grupo de trabajo en hipotálamo de ratas de día post-natal (Grayson, et al., 2013). Sería importante probar otra sonda dirigida contra este mismo gen (por ejemplo: Rn01473378_m1). Esto para poder discernir si fue un problema técnico o en realidad no se expresa *POMC* en esta línea celular.

Una vez sabiendo que estos genes se expresaban en nuestro modelo celular de estudio, lo siguiente fue privar de glucosa a las células (1 hora) y después presentarles

diferentes estímulos de glucosa (4.5 mM u 11 mM) con o sin galantamina (2 horas), para observar el posible efecto del medicamento sobre los genes reguladores de la balanza energética.

Se sabe que *AgRP* es un gen orexigénico, que induce la ingesta de alimentos (Gouveia et al., 2021). Se esperaba que el transcrito aumentara en condiciones de privación de glucosa (en ausencia de galantamina) y, por otro lado, disminuyera al incrementar la concentración de glucosa. Sin embargo, en nuestros resultados no se observó diferencia significativa entre los distintos tratamientos. En un estudio reciente, donde se utilizó la línea celular mHypoE-29/1 (ratón embrionario de 15-18 días; Belsham et al., 2004), se observó que al ser estimuladas durante 2 horas con una concentración de 5.0 mM de glucosa, la cual, se parece a la concentración de glucosa postprandial de humanos (<7.8 mM), la expresión de *AgRP* disminuyó comparado con el grupo control (0.5 mM, parecida a la concentración de glucosa en privación de glucosa 3.9 mM; Chalmers et al., 2014; American Diabetes Assosiation, 2001). Nuestros resultados fueron inesperados, ya que la línea celular IVB (E19), utilizada en este proyecto y la línea celular mHypoE-29/1 (E18) tienen un día de diferencia de desarrollo, por lo que esperaríamos que se comportaran de manera similar a la respuesta de glucosa. Además, se ha reportado que al tratar a células hipotalámicas de rata (en la línea celular N-38, E15-18) con menor concentración de glucosa (0.5 mM) por 24 horas y posteriormente estimulando con 10 mM de glucosa por un día, la expresión de *AgRP* decae (Cheng et al., 2008). Por lo tanto, más experimentos se necesitarían realizar para corroborar la

respuesta de este gen en la línea celular IVB hipotalámica (E19) en condiciones de privación de glucosa y a distintas concentraciones de glucosa (sin medicamento).

Sin embargo, al estimular a las células IVB con galantamina, se observó que el transcrito de *AgRP* tuvo una tendencia a disminuir en todas las condiciones (privación de glucosa y glucosa), excepto con medio. Interesantemente, la disminución del transcrito fue significativa en las células expuestas a privación de glucosa + 11mM glucosa con galantamina, comparadas contra las mismas condiciones, pero sin galantamina. Esto sugiere que la galantamina reduce el transcrito del gen orexigénico *AgRP*, principalmente en un estado de alta carga energética (11 mM glucosa) después de la privación de glucosa, lo cual pudiera estar implicado en la pérdida de peso de pacientes que consumen este medicamento.

Estudios en ratas Sprague-Dawley, tratadas subcrónicamente con olanzapina a 3 mg/kg durante 5 días y sacrificadas después de la privación de glucosa de 24 horas, se observó que los niveles de expresión de *AgRP* aumentaron, comparado con el grupo que no tenía medicamento (Fernø et al., 2011) La olanzapina es un antipsicótico que provoca el aumento de peso, contrario a lo observado con la galantamina. Es decir, la expresión de *AgRP* aumenta con el tratamiento de olanzapina, lo que coincide con el aumento de peso. Por el contrario, la metformina es un medicamento que reduce la ingesta de alimento, al igual que la galantamina. Al suministrar una dosis de 300 mg/kg de metformina por 4 semanas en ratas Sprague-Dawley machos, y sacrificarlas después de 12 horas de ayuno, la expresión de *AgRP* disminuye, comparado con aquellas ratas tratadas con vehículo (Lv et al., 2012). Es decir, la metformina disminuye la expresión de *AgRP*, en concordancia con una reducción de la ingesta, lo que conlleva a una baja del

peso (Yerevanian & Soukas, 2019). Por otra parte, los ratones KO para *AChE* no presentan un aumento de peso, aunque ingieran más calorías que los controles silvestres (Duysen et al., 2002). Asimismo, otro estudio menciona que los ratones KO para *AChE*, presentan un retraso tanto en el aumento de peso como en el crecimiento a partir del día 7 postnatal, comparado con los controles (Xie & Lockridge, 2000). Los artículos anteriores únicamente presentan un análisis fenotípico, sin investigar las vías metabólicas, ni la balanza energética. Es por esto que, se podría pensar que la galantamina, al inhibir la acción de la *AChE*, reduce el peso de pacientes, debido a la inhibición de la ingesta, vía la baja expresión de *AgRP*. De todas formas, son necesarios más estudios para comprender la vía por la cual la inhibición de *AChE* genera una disminución de dicho gen.

Por otra parte, los ratones adultos KO para *AgRP*, presentan una pérdida progresiva de apetito y de peso, llegando a pesar hasta un 20% menos de su peso inicial (Luquet et al., 2005; Wu et al., 2008), sin existir diferencias significativas en la expresión de los otros genes implicados en la balanza energética como *POMC*, *MC4R* y *CART* (Qian et al., 2002).

Finalmente, nuestros resultados sugieren que la galantamina reduce la expresión de *AgRP*, un gen orexigénico, sin modificar a los otros genes reguladores de la balanza energética. Esto en el paciente podría provocar una inhibición de la ingesta, y, por lo tanto, un decremento en el peso corporal.

Además de *AgRP*, existe otro gen que también desencadena una respuesta orexigénica, *NPY* (Assan et al., 2021). En los tratamientos sin medicamento, se esperaba

un decremento en la expresión de *NPY* en las concentraciones de glucosa, al igual que lo esperado para *AgRP*. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia entre la privación de glucosa y las diferentes concentraciones de glucosa. Por otra parte, en los tratamientos con galantamina, nuestros resultados son difíciles de concluir, ya que la expresión de *NPY* fue muy baja en nuestro modelo de estudio: la línea celular IVB. Por ejemplo, para las condiciones de privación de glucosa + 4.5 u 11mM de glucosa y en presencia de galantamina, no se obtuvieron resultados. Por una parte, pudiera indicar que la galantamina reduce la expresión de *NPY* aún más que cuando no se tratan las células con el medicamento. Sin embargo, debido a problemas técnicos, falta de triplicados y replicación entre los diferentes tratamientos y experimentos, es arriesgado concluir si la galantamina tiene un efecto inhibitorio en la expresión de *NPY*.

No obstante, un estudio *ex-vivo* en rebanadas de hipotálamo de ratas Sprague-Dawley macho, reportó que, en una concentración de 10 mM de glucosa, no se presentaron diferencias significativas en la liberación de *NPY* entre las ratas alimentadas o en privación de glucosa (2 días). Sin embargo, al estimular las rebanadas con diferentes concentraciones de glucosa (10 mM u 1.4 mM), aumentó la liberación de *NPY* en presencia de una baja concentración de glucosa, sin importar el estado de privación de glucosa o de alimentación de las ratas (Ann Murphy et al., 2009). No obstante, en este artículo no se reportó la expresión de *NPY*, pero se pudiera inferir que sería alta en presencia de 1.4 mM de glucosa.

Por otro lado, la risperidona es un antipsicótico que incrementa el peso, efecto contrario a la galantamina. Se observó que, en ratones hembra (C57BL/6J) de 8 semanas de edad, el tratamiento con una dosis de 2 mg/kg por 4 semanas de risperidona,

aumentó el transcrito de *NPY* con respecto a ratones tratados con solución salina (Wan et al., 2020) Por lo tanto, esto sugiere que la risperidona aumenta los niveles de *NPY*, un gen orexigénico, y *por ende* incrementa el peso corporal. En cambio, en nuestros resultados, en el grupo tratado con galantamina no se observó expresión de *NPY*. Esto podría deberse a que la galantamina inhibió la expresión del gen totalmente, aunque cabe también la posibilidad de que haya habido problemas técnicos. Sin embargo, se necesitan más experimentos para poder corroborar el efecto de galantamina sobre la expresión de *NPY*.

Además, se estudiaron genes que regulan la balanza energética con una respuesta anorexigénica: *POMC* y *CART*. Como se mencionó anteriormente, para *POMC* no se obtuvieron resultados de la expresión de este gen bajo ningún tratamiento. Con respecto a *CART*, se esperaría una respuesta contraria a los genes *AgRP* y *NPY*, presentando un aumento en su expresión en presencia de una mayor cantidad de glucosa. En un trabajo realizado en ratones (C56BL/6NHsd) de 6-7 semanas de edad, se reportó que después de privarles de alimento durante 20 horas e inyectarles 400 µg/2 µl de glucosa de forma intracerebroventricular, la expresión de *CART* aumentó significativamente a diferencia de los ratones control (Cha et al., 2008) En nuestros resultados se nota una tendencia al aumento de la expresión de este gen al exponer las células a una concentración más alta de glucosa y sin tratamiento de galantamina, sin ser significativa la diferencia.

Por otra parte, cuando se estimularon las células IVB con galantamina, no hubo diferencias de la expresión de *CART* entre los tratamientos de privación de glucosa o con glucosa. Un reporte mostró que el tratamiento de olanzapina, un antipsicótico que

provoca el aumento de peso, no provocó cambios en la expresión del gen en ratas Sprague-Dawley, ayunadas por 24 horas (Fernø et al., 2011). Esto sugiere que la galantamina y la olanzapina no regulan la expresión de *CART*, por lo tanto, el cambio de peso corporal, observado por el tratamiento de estos medicamentos, no se debe a la expresión de este gen.

Por último, el gen *MC4R* codifica para el receptor de los péptidos de *AgRP* y *POMC*, lo que genera las cascadas de señalización orexigénica y anorexigénica, respectivamente (Cone, 2006). Nuestros resultados no mostraron diferencia de expresión en *MC4R* en privación de glucosa o a diferentes concentraciones de glucosa en ausencia de la galantamina. Para este gen no se encontraron estudios realizados *in vitro* que reporten la expresión de *MC4R* con diferentes concentraciones de glucosa. Sin embargo, en un estudio en ratas Sprague-Dawley macho expuestas a: 1) una dieta normal (*chow diet*) durante 35 días o 2) una dieta alta en energía (*high energy*) durante 14 días, se comparó la expresión de *MC4R* al exponer a estos dos grupos a una dieta alta en energía de forma aguda por 12 horas. Se observó que *MC4R* no cambió su expresión (Archer et al., 2005), lo que sugiere que *MC4R* no se regula por concentraciones de glucosa, similar a lo que observamos en nuestro cultivo celular.

Por otra parte, se ha estudiado la expresión de *MC4R* en presencia de risperidona, un antipsicótico que aumenta el peso corporal. En ratones (C57BL/6) hembras tratadas con una dieta regular, a la cual se le añadieron 25 mg/kg de risperidona por 5 o 14 días, se observó que el gen *MC4R* disminuyó su expresión, comparado con el grupo control; además, se observó hiperfagia y aumento de peso corporal a partir de los 14 días de

tratamiento (Li et al., 2021). Esto es consistente con lo reportado anteriormente: la ausencia de *MC4R* produce hiperfagia y aumento de peso, lo que conlleva a la obesidad tanto en ratones como en humanos (Balthasar et al., 2005; Farooqi, 2006).

En nuestro modelo, la expresión de este gen disminuyó bajo el tratamiento con galantamina. Estos resultados son inesperados, ya que se sabe que los ratones *MC4R KO* presentan hiperfagia y un aumento de peso (You et al., 2016). Esto es contradictorio con nuestros resultados, ya que al haber menor expresión de *MC4R* en presencia de la galantamina, esto sugeriría un aumento de la ingesta de alimentos en los pacientes. Por esto mismo, los datos obtenidos en este trabajo para *MC4R*, representan un primer acercamiento al efecto de la galantamina sobre este gen; sin embargo, son necesarios más trabajos para corroborar esta respuesta y posteriormente, traducirlos a modelos *in vivo* y más adelante al posible efecto en seres humanos.

Los resultados obtenidos en este proyecto muestran que el tratamiento con galantamina disminuye la expresión de *AgRP* en condiciones de alta glucosa (11 mM) en las células IVB. Este es un gen que, al unir su péptido con el receptor *MC4R*, desencadena una respuesta orexigénica. Por lo tanto, la baja expresión de *AgRP*, inhibe dicha respuesta orexigénica, lo cual sugiere que se reduzca la ingesta y, por lo tanto, exista una disminución del peso corporal.

Limitantes del trabajo

Este proyecto es el primer trabajo que aborda el efecto de la galantamina en la línea celular IVB, siendo una opción para no utilizar un modelo animal. Por otro lado, esta línea celular específica, no había sido utilizada antes para proyectos sobre la balanza energética, por lo que hay poca información al respecto y muestra una limitante de nuestro sistema. En esta línea celular se hicieron varios intentos para obtener la expresión de *POMC* sin lograrlo. Asimismo, *CART* y *NPY* presentaron una expresión relativamente baja. Estos resultados nos llevan a pensar que, en las células obtenidas del cultivo primario, de donde se hizo este cultivo celular, no se obtuvieron suficientes neuronas *POMC* y *NPY*, por lo que la expresión fue baja.

Por otro lado, las células hipotalámicas utilizadas en el proyecto no fueron extraídas de ratas adultas con EA. Esto podría resultar en una limitante, pues la galantamina únicamente se administra en pacientes con diagnóstico de EA. Además, la línea celular IVB es embrionaria, lo que puede resultar en un funcionamiento diferente en la expresión génica y regulación de la balanza energética, comparado con ratas adultas. Aunado a esto, los resultados obtenidos a partir de estudios *in vitro*, de un cultivo celular, deben tomarse con precaución, ya que existe una brecha entre las conclusiones de un experimento presentado en un cultivo celular y lo que sucede en un organismo completo, como serían los pacientes con EA.

Finalmente, este trabajo muestra una primera aproximación para ver el efecto de la galantamina sobre la regulación de la balanza energética, por lo que más estudios deben ser realizados para concluir sobre el efecto de la galantamina, un bloqueador de la AChE, sobre genes reguladores de la balanza energética.

Conclusión

La galantamina reduce la expresión de *AgRP* en un cultivo celular de las células IVB hipotalámicas de rata, principalmente en un estado de alta carga energética (11 mM de glucosa). Esto sugiere que al haber una disminución en el péptido orexigénico, la ingesta de alimentos disminuiría y podría explicar la pérdida de peso en pacientes con EA (Figura 11).

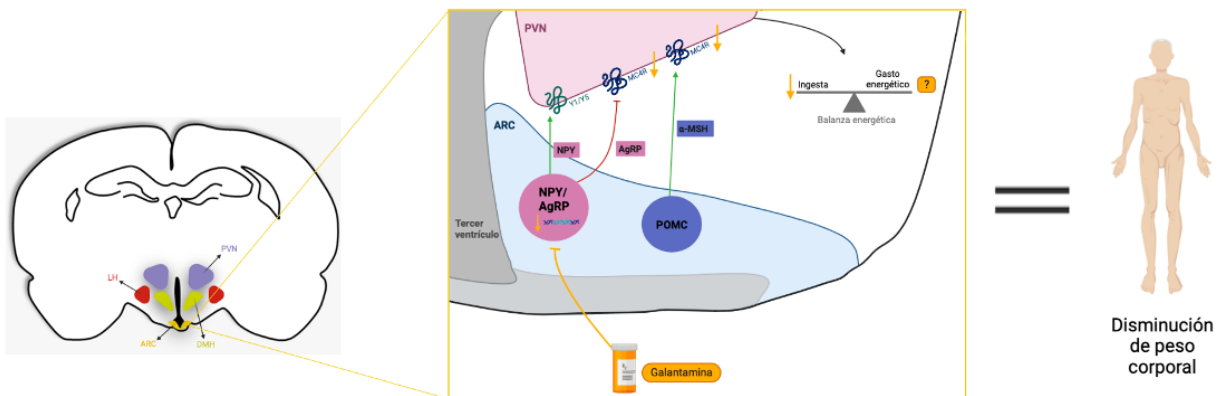


Figura 11: Efecto de la galantamina sobre el gen *AgRP* y *MC4R* en la línea celular hipotalámica IVB. Se observa del lado izquierdo un corte coronal del hipotálamo de donde se obtuvo la línea celular IVB. Del lado derecho, un acercamiento al núcleo arqueado, donde se propone que la galantamina suprime la expresión del gen *AgRP* (orexigénico; línea amarilla). Además, se nota un decremento en la expresión de *MC4R* (receptor; flecha amarilla). Esto podría influir en la balanza energética, lo que se traduciría en una disminución del peso en los pacientes con EA bajo el tratamiento de galantamina. LH: hipotálamo lateral; ARC: núcleo arqueado; DMH: hipotálamo dorsomedial; PVN: núcleo paraventricular. Flecha verde: acción; flecha roja: inhibición.

Perspectivas

Para futuras investigaciones se podrían utilizar modelos murinos adultos y con EA, a los cuales se les administre la galantamina y se mida la ingesta de alimentos a 1, 2, 4 y 24 horas, lo que podría demostrar si el medicamento reduce el apetito de forma aguda. Además, se podría administrar la galantamina durante varias semanas, para medir la ingesta y peso corporal semanalmente y observar si los animales pierden peso. Por último, se sacrificarían los animales y se obtendría el hipotálamo. Finalmente, se medirían los transcritos de los genes orexigénicos (*AgRP* y *NPY*), anorexigénicos (*CART* y *POMC*) y de receptor (*MC4R*) para observar el efecto que tiene el medicamento sobre dichos genes después de un tratamiento *in vivo*.

Referencias

- Abramov, E., Dolev, I., Fogel, H., Ciccotosto, G. D., Ruff, E., & Slutsky, I. (2009). Amyloid-B as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*, *12*(12), 1567–1576.
<https://doi.org/10.1038/nn.2433>
- Ahmadian-Moghadam, H., Sadat-Shirazi, M. S., & Zarrindast, M. R. (2018). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART): A multifaceted neuropeptide. In *Peptides* (Vol. 110, pp. 56–77). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.10.008>
- American Diabetes Assosiation. (2001). *Postprandial Blood Glucose*.
- Ann Murphy, B., Fioramonti, X., Jochnowitz, N., Fakira, K., Gagen, K., Contie, S., Lorsignol, A., Penicaud, L., Martin, W. J., Routh, V. H., & Routh, V. H. (2009). Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. *Am J Physiol Cell Phys-Iol*, *296*, 746–756. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00641.2008.-Fasting>
- Archer, Z. A., Rayner, D. v., Duncan, J. S., Bell, L. M., & Mercer, J. G. (2005). Introduction of a high-energy diet acutely up-regulates hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript, Mc4R and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression in male sprague-dawley rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *17*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01269.x>

- Assan, D., Mustapha, U. F., Chen, H., Li, Z., Peng, Y., & Li, G. (2021). The roles of neuropeptide Y (Npy) and peptide YY (Pyy) in teleost food intake: A mini review. In *Life* (Vol. 11, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11060547>
- Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C. Y., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J. K., & Lowell, B. B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, *123*(3), 493–505. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.035>
- Belsham, D. D., Cai, F., Cui, H., Smukler, S. R., Salapatek, A. M. F., & Shkreta, L. (2004). Generation of a Phenotypic Array of Hypothalamic Neuronal Cell Models to Study Complex Neuroendocrine Disorders. *Endocrinology*, *145*(1), 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0946>
- Bouzig, D., Vila, J., Hansen, G., Manissero, D., Pareja, J., Rao, S. N., & Visseaux, B. (2021). *Systematic review on the association between respiratory virus real-time PCR cycle threshold values and clinical presentation or outcomes*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab246>
- Brischoux, F., Griffond, B., Fellmann, D., & Risold, P. Y. (2002). Early and transient ontogenetic expression of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the rat mesencephalon: Correlation with tyrosine hydroxylase expression. *Journal of Neurobiology*, *52*(3), 221–229. <https://doi.org/10.1002/neu.10077>

- Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., & Robinson, S. R. (2018). The physiological roles of amyloid- β peptide hint at new ways to treat Alzheimer's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 10, Issue APR). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00118>
- Chalmers, J. A., Jang, J. J., & Belsham, D. D. (2014). Glucose sensing mechanisms in hypothalamic cell models: Glucose inhibition of AgRP synthesis and secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), 262–270.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.10.013>
- Cone, R. D. (2006). Studies on the physiological functions of the melanocortin system. In *Endocrine Reviews* (Vol. 27, Issue 7, pp. 736–749). Endocrine Society.
<https://doi.org/10.1210/er.2006-0034>
- Dalvi, P., Loganathan, N., Mcilwraith, E. K., Tran, A., & Belsham, D. D. (2021). *Hypothalamic Cell Models* (A. Ulloa-Aguirre & Y.-X. Tao, Eds.). Elsevier.
- Droogsma, E., van Asselt, D., & de Deyn, P. P. (2015). Gewichtsverlust und Unterernährung bei selbstständig lebenden Patienten mit Alzheimer-Demenz: Von populationsbasierten Studien zum klinischen Management. *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie*, 48(4), 318–324. <https://doi.org/10.1007/s00391-015-0891-2>
- Duysen, E. G., Stribley, J. A., Fry, D. L., Hinrichs, S. H., & Lockridge, O. (2002). Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult acetylcholinesterase deficient mouse. In *Developmental Brain Research* (Vol. 137). www.elsevier.com/locate/bres

- Erkkinen, M. G., Kim, M. O., & Geschwind, M. D. (2018). Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033118>
- Farlow. (2001). Pharmacokinetic profiles of current therapies for Alzheimer's disease: Implications for switching to galantamine. *Clinical Therapeutics*, 23(SUPPL. A), A13--A24.
[http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L32463749%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S0149-2918\(01\)80164-8](http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L32463749%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/S0149-2918(01)80164-8)
- Farlow, M. R. (2003). *of Galantamine*. 42(15), 1383–1392.
- Farooqi, I. S. (2006). Chapter 6: Monogenic human obesity syndromes. In *Progress in Brain Research* (Vol. 153, pp. 119–125). [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)53006-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)53006-7)
- Fernø, J., Varela, L., Skrede, S., Vázquez, M. J., Nogueiras, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A., Steen, V. M., & López, M. (2011). Olanzapine-induced hyperphagia and weight gain associate with orexigenic hypothalamic neuropeptide signaling without concomitant AMPK phosphorylation. *PLoS ONE*, 6(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020571>
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. In *Current Neuropharmacology* (Vol. 14).
- Gouveia, A., de Oliveira Beleza, R., & Steculorum, S. M. (2021). AgRP neuronal activity across feeding-related behaviours. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 54,

Issue 10, pp. 7458–7475). John Wiley and Sons Inc.

<https://doi.org/10.1111/ejn.15498>

Grayson, B. E., Schneider, K. M., Woods, S. C., & Seeley, R. J. (2013). Improved rodent maternal metabolism but reduced intrauterine growth after vertical sleeve gastrectomy. *Science Translational Medicine*, 5(199).

<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006505>

Hempel, H., Mesulam, M. M., Cuello, A. C., Farlow, M. R., Giacobini, E., Grossberg, G. T., Khachaturian, A. S., Vergallo, A., Cavedo, E., Snyder, P. J., & Khachaturian, Z. S. (2018). The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*, 141(7), 1917–1933.

<https://doi.org/10.1093/brain/awy132>

Huang, F., & Fu, Y. (2010). A Review of Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Galantamine, a Reversible Acetylcholinesterase Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease, in Healthy Subjects and Patients. In *Current Clinical Pharmacology* (Vol. 5).

Ishii, M., & Iadecola, C. (2015). Metabolic and Non-Cognitive Manifestations of Alzheimers Disease: The Hypothalamus as Both Culprit and Target of Pathology.

Cell Metabolism, 22(5), 761–776. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.016>

Jann, M. W. (2000). Rivastigmine, a new-generation cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. In *Pharmacotherapy* (Vol. 20, Issue 1 I, pp. 1–12). Pharmacotherapy Publications Inc. <https://doi.org/10.1592/phco.20.1.1.34664>

- Kageyama, K., Hanada, K., Iwasaki, Y., & Suda, T. (2009). Regulation and role of suppressor of cytokine signaling-3 in hypothalamic 4B cells. *Journal of Endocrinology*, 201(3), 369–376. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0506>
- Kagotani, Y., Hashimoto, T., Tsuruo, Y., Kawano, H., Daikoku, S., & Chihara, K. (1989). *DEVELOPMENT OF THE NEURONAL SYSTEM CONTAINING NEUROPEPTIDE Y IN THE RAT HYPOTHALAMUS* (Vol. 7, Issue 4).
- Kalola, U. K., & Nguyen, H. (2002). *Galantamine*. StatPearls Publishing.
- Kasckow, J., Mulchahey, J. J., Aguilera, G., Pisarska, M., Nikodemova, A. M., Chen, H.-C., Herman, J. P., Murphy, E. K., Liu, Y., Rizvi, T. A., Dautzenberg, F. M., & Sheriffy, S. (2003). *Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Expression and Protein Kinase A Mediated CRH Receptor Signalling in an Immortalized Hypothalamic Cell Line*.
- Kovacs, G. G. (2018). Concepts and classification of neurodegenerative diseases. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 145). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00021-3>
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Riber, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J., & Hastrup, S. (1998). *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*.
- Li, L., Yoo, E. S., Li, X., Wyler, S. C., Chen, X., Wan, R., Arnold, A. G., Birnbaum, S. G., Jia, L., Sohn, J. W., & Liu, C. (2021). The atypical antipsychotic risperidone targets hypothalamic melanocortin 4 receptors to cause weight gain. *Journal of Experimental Medicine*, 218(7). <https://doi.org/10.1084/jem.20202484>

- Lilienfeld, S. (2002). Galantamine-a Novel Cholinergic Drug with a Unique Dual Mode of Action for the Treatment of Patients with Alzheimer's Disease. In *CNS Drug Reviews* (Vol. 8, Issue 2).
- Liu, Y., Kalintchenko, N., Sassone-Corsi, P., & Aguilera, G. (2006). Inhibition of corticotrophin-releasing hormone transcription by inducible cAMP-early repressor in the hypothalamic cell line, 4B. *Journal of Neuroendocrinology*, 18(1), 42–49.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01383.x>
- Luquet, S., Perez, F. A., Hsasko, T. S., & Palmiter, R. D. (2005). NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates. *Science*.
- Madav, Y., Wairkar, S., & Prabhakar, B. (2019). Recent therapeutic strategies targeting beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 146, pp. 171–184). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.004>
- Maelicke, A., & Albuquerque, E. X. (2000). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 393). www.elsevier.nl/locate/ejphar
- Matsunaga, S., Fujishiro, H., & Takechi, H. (2019). Efficacy and Safety of Cholinesterase Inhibitors for Mild Cognitive Impairment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's Disease*, 71(2), 513–523.
<https://doi.org/10.3233/JAD-190546>
- Miller, S. (2008). *THE DANGER OF WEIGHT LOSS IN THE ELDERLY*.

- Mountjoy, K. G., & Wild, J. M. (1998). Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. In *Developmental Brain Research* (Vol. 107).
- Nguyen, K., Hoffman, H., Chakkamparambil, B., & Grossberg, G. T. (2021). Evaluation of rivastigmine in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative Disease Management*, 11(1), 35–48. <https://doi.org/10.2217/nmt-2020-0052>
- Nordberg, A. (2001). *Nicotinic Receptor Abnormalities of Alzheimer's Disease: Therapeutic Implications*.
- Nordberg, A., & Winblad, B. (1986a). Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. In *Neuroscience Letters* (Vol. 72).
- Nordberg, A., & Winblad, B. (1986b). Reduced number of [3H]nicotine and [3H]acetylcholine binding sites in the frontal cortex of Alzheimer brains. In *Neuroscience Letters* (Vol. 72).
- OMS. (2020). *Dementia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Parent, A., & Butcher, L. L. (1976). *Organization and Morphologies of Acetylcholinesterase-containing Neurons in the Thalamus and Hypothalamus of the Rat*.
- Proulx, K., & Seeley, R. J. (2005). The regulation of energy balance by the central nervous system. *Psychiatric Clinics of North America*, 28(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2004.09.005>
- Qian, S., Chen, H., Weingarh, D., Trumbauer, M. E., Novi, D. E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., Chen, A., Camacho, R. E., Shearman, L. P., Gopal-

- Truter, S., MacNeil, D. J., van der Ploeg, L. H. T., & Marsh, D. J. (2002). Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), 5027–5035. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.14.5027-5035.2002>
- Qin, L., Tiwari, A. K., Zai, C. C., Freeman, N., Zhai, D., Liu, F., Stachelscheid, H., Mergenthaler, P., Kennedy, J. L., & Müller, D. J. (2020). Regulation of melanocortin-4-receptor (MC4R) expression by SNP rs17066842 is dependent on glucose concentration. *European Neuropsychopharmacology*, 37, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2020.05.008>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). *An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis.*
- Razay, G., & Wilcock, G. K. (2008). Galantamine in Alzheimer's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(1), 9–17. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.1.9>
- Robert Briggs, S. P. K. and D. O. (2016). Drug treatments in Alzheimer's disease. *Royal College of Physicians*, 16, 247–253. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-247>
- Rodrigo, J., Martínez, A., Fernández, A. P., Serrano, J., Bentura, M. L., Moreno, E., Aparicio, M., Martínez-Murillo, R., & Regidor, J. (2007). Características neuropatológicas y moleculares de la enfermedad de Alzheimer. *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia*, 42(2), 103–110. [https://doi.org/10.1016/S0211-139X\(07\)73533-3](https://doi.org/10.1016/S0211-139X(07)73533-3)
- Salvador, J., & Frühbeck, G. (2005). Regulación de la ingesta alimentaria: Una perspectiva clínica. In *Endocrinología y Nutricion* (Vol. 52, Issue 8, pp. 404–430). Ediciones Doyma, S.L. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(05\)71040-8](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(05)71040-8)

- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*(6778), 661–671.
<https://doi.org/10.1038/35007534>
- Serrano-Cumplido, A., Ruiz Garcia, A., Segura-Fragoso, A., Olmo-Quintana, V., Micó Pérez, R. M., Barquilla-García, A., & Morán-Bayón, A. (2021). Application of the PCR number of cycle threshold value (Ct) in COVID-19. In *Semergen* (Vol. 47, Issue 5, pp. 337–341). Ediciones Doyma, S.L.
<https://doi.org/10.1016/j.semERG.2021.05.003>
- Shenhar-Tsarfaty, S., Sherf-Dagan, S., Berman, G., Webb, M., Raziel, A., Keidar, A., Goitein, D., Sakran, N., Zwang, E., Shapira, I., Zeltser, D., Berliner, S., Rogowski, O., Shibolet, O., & Zelber-Sagi, S. (2019). Obesity-related acetylcholinesterase elevation is reversed following laparoscopic sleeve gastrectomy. *International Journal of Obesity*, *43*(2), 297–305. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0014-4>
- Tan, L. (2014). Efficacy and safety of donepezil, galantamine, rivastigmine, and memantine for the treatment of Alzheimer’s disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Alzheimer’s Disease : JAD*, *41*(2), 615–631.
<https://doi.org/10.3233/JAD-132690>
- Thomsen, T., Kaden, B., Fischer, J. P., Bickel, U., Barz, H., Gusztony, G., Cervos-Navarro, J., & Kewitz, J. (1991). Inhibition of Acetylcholinesterase Activity in Human Brain Tissue and Erythrocytes by Galanthamine, Physostigmine and Tacrine. In *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem* (Vol. 29).
- Tsoi, K. K. F., Chan, J. Y. C., Chan, F. C. H., Hirai, H. W., Kwok, T. C. Y., & Wong, S. Y. S. (2019). Monotherapy Is Good Enough for Patients with Mild-to-Moderate

Alzheimer's Disease: A Network Meta-analysis of 76 Randomized Controlled Trials. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 105(1), 121–130.

<https://doi.org/10.1002/cpt.1104>

Vega, I. E., Cabrera, L. Y., Wygant, C. M., Velez-Ortiz, D., Counts, S. E., & Abisambra, J. (2017). Alzheimer's Disease in the Latino Community: Intersection of Genetics and Social Determinants of Health. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(4), 979–992. <https://doi.org/10.3233/JAD-161261>

Vercruyse, P., Vieau, D., Blum, D., Petersén, Å., & Dupuis, L. (2018). Hypothalamic alterations in neurodegenerative diseases and their relation to abnormal energy metabolism. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11(January), 1–16.

<https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00002>

Wu, Q., Howell, M. P., Cowley, M. A., & Palmiter, R. D. (2008). *Starvation after AgRP neuron ablation is independent of melanocortin signaling.*

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712062105

Xie, W., & Lockridge, O. (2000). Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase ESTHER Database (ESTerases and alpha/beta-Hydrolase Enzymes and Relatives) View project Genetic control of the respiratory controlling neuronal network in transgenic mice View project. In *Article in Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. <http://www.jpvet.org>

Zemek, F., Drtinova, L., Nepovimova, E., Sepsova, V., Korabecny, J., Klimes, J., & Kuca, K. (2014). Outcomes of Alzheimer's disease therapy with acetylcholinesterase inhibitors and memantine. In *Expert Opinion on Drug Safety*

(Vol. 13, Issue 6, pp. 759–774). Informa Healthcare.

<https://doi.org/10.1517/14740338.2014.914168>