



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**DETERMINAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RESPONSABLES DE ACTIVAR A
LAS NEURONAS TRHÉRGICAS DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL
HIPOTÁLAMO EN RESPUESTA AL CONSUMO AGUDO DE DIETA RICA EN GRASA
EN LA RATA MACHO ADULTA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Marlen Asucena Ramírez Bustos

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Rosa María Uribe Villegas

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

DRA. MARÍA ANGÉLICA SANTANA CALDERÓN

Centro de Investigación en Dinámica Celular (UAEM)

PRESIDENTE

DRA. ROBERTA SALINAS MARÍN

Centro de Investigación en Dinámica Celular (UAEM)

SECRETARIO

DR. JEAN-LOUIS JOSEPH MARIE CHARLI CASALONGA

Instituto de Biotecnología (UNAM)

VOCAL

DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA (UAEM)

SUPLENTE

DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS

Instituto de Biotecnología (UNAM)

SUPLENTE

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

DRA. ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS

Instituto de Biotecnología (UNAM)

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAMÓN ANTONIO GONZÁLEZ GARCÍA-CONDE

Centro de Investigación en Dinámica Celular (UAEM)

TUTOR DE SEGUIMIENTO

DRA. VERONICA MERCEDES NARVÁEZ PADILLA

Centro de Investigación en Dinámica Celular (UAEM)

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroendocrinología Celular y Molecular, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Rosa María Uribe Villegas.

Este proyecto fue parcialmente financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM, Proyecto PAPIIT IN212411 y IN215420. La estudiante recibió una beca de Maestría del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Becaria 750381).

RESUMEN

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH), producida en la región parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), está involucrada en la regulación del metabolismo basal y la termogénesis. La actividad de estas neuronas TRHérgicas se modifica en respuesta a cambios en el balance energético del organismo. Previamente, demostramos que el consumo por 3 días de dieta alta en grasa (DAG: 45% de calorías provenientes de grasa), eleva la concentración circulante de leptina, así como el nivel del RNAm del TRH en el NPV. Además, observamos que la leptina no participa en la regulación de la biosíntesis del TRH en esta condición, puesto que no encontramos mayor expresión de las proteínas STAT3 o CREB fosforiladas en las neuronas TRHérgicas en respuesta al consumo de DAG. En este trabajo demostramos que el factor transcripcional cFos no se induce en las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo, en respuesta al consumo agudo de DAG. Sabemos que la ingestión de DAG eleva la concentración circulante de triglicéridos y ácidos grasos libres en horas, por lo que tratamos de definir, si estas moléculas participan en la regulación de la biosíntesis del TRH en el NPV, en respuesta al consumo de DAG o a la aplicación intraperitoneal de lipofundin 20%. Analizamos el nivel del RNAm del TRH en el NPV de ratas ayunadas durante 12 h y sacrificadas a las 2 y 4 h después de ser alimentadas con DAG (60% de calorías provenientes de grasa), dieta regular (DR:18% de calorías provenientes de grasa), o bien inyectadas con (17 mL/kg) de lipofundin 20% o solución salina isotónica. La concentración de triglicéridos en los grupos alimentados con DAG o inyectados con lipofundin a las 2 y 4 h se incrementó vs su grupo control, sin cambio en la concentración de leptina. Sin embargo, solo observamos un aumento en la expresión del RNAm del TRH en el NPV en respuesta al consumo de la DAG por 4 h. También, observamos que los triglicéridos o ácidos grasos generados en respuesta a la aplicación de lipofundin (4 h), no incrementaron el número de células positivas a cFos en el NPV, mientras que si en el núcleo arcuato. Estos resultados sugieren que los triglicéridos o ácidos grasos libres generados por el consumo de DAG saturada son capaces de inducir la biosíntesis del TRH en el NPV de la rata, quedando por definir si la vía de señalización de los triglicéridos es directa o indirecta. En conclusión, estos resultados apoyan que los cambios en la concentración de la leptina no son responsables de inducir la biosíntesis del RNAm del TRH en respuesta al consumo de DAG por tiempo corto en la rata macho.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Rosa María Uribe Villegas por aceptar dirigir este trabajo, por su interés constante en mi desarrollo personal y académico, por su comprensión y su tiempo. Por esa humildad que la caracteriza como ser humano, por su dedicación y su enorme paciencia.

Al Dr. Jean Louis Charli Casalonga, por aceptarme para trabajar en el laboratorio como tesista del Posgrado en Ciencias, por el apoyo brindado durante este período de tiempo, por sus correcciones y sugerencias a lo largo del proyecto.

A la Dra. Patricia Joseph Bravo por sus críticas constructivas a lo largo de este proyecto.

Agradezco a la L.N. Ma. Teresa Torres Solís, Sr. Manuel Villa Herrera y a la Dra. Lorraine Jaimes-Hoy, por su apoyo en la producción de los animales utilizados en este proyecto. Por el apoyo técnico recibido durante la realización del proyecto: QFB. Miguel Cisneros Ramírez (realización de Elisás), QI Fidelia Romero Arteaga (preparación de reactivos para purificación de RNA), Sr. Sergio González Trujillo (apoyo técnico durante el sacrificio de animales), Dra. Karina Hernández Ortega (asesoría en la técnica de qPCR), M. C. Arturo Ocádiz Ramírez por apoyo en bioinformática, B.A. Dip. Lib. A. LA. Shirley Elizabeth Ainsworth Gore, por su apoyo en la biblioteca y obtención de artículos científicos.

A la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez por su participación constante en la discusión de artículos.

Al Dr. Ramón Antonio González García-conde y la Dra. Verónica Mercedes Narváez padilla, por aceptar ser parte de mi comité tutorial, por las correcciones y sugerencias que me permitieron realizar un proyecto mejor estructurado.

Agradezco infinitamente a mi mamá, María Elena, por ser la persona más especial que Dios me ha permitido tener a mi lado, por apoyarme siempre, por no soltarme nunca, por impulsarme a seguir adelante cuando el viento nos doblaba fuerte. ¡GRACIAS!

A mis amigos (Ana, Oscar, Josselin, Grecia, Mari Tere, Alicia...), por estar siempre presentes, por saber comprender que no siempre me era posible estar, por escucharme siempre, por soportarme en mis momentos de estrés, por impulsarme a continuar.

A Abel por acompañarme en las noches de desvelo, por escucharme, por apoyarme y ser una persona especial.

Agradezco de todo corazón al personal del Colegio de Bachilleres Plantel 43, por todo el apoyo que me brindo en su momento y que me sigue brindando.

A todos ustedes

¡Gracias!

Dedicada con el máspreciado y sincero cariño a:

Mis padres

Lo que más amo de la ciencia es que a medida que aprendes, realmente no obtienes respuestas, solo tienes mejores preguntas.

(John Green)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 La obesidad en el mundo y su etiología	4
2.2 Participación de los núcleos y neuropéptidos hipotalámicos en la regulación de la homeostasis energética	6
2.3 Señalización de lípidos a nivel hipotalámico	9
2.4 La hormona liberadora de tirotropina	11
2.5 Biosíntesis de la hormona liberadora de tirotropina	12
2.6 Degradación de la hormona liberadora de tirotropina	14
2.7 Papel del TRH en el eje Hipotálamo-Pituitario-Tiroides	16
2.8 Regulación de la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotropina del NPV	17
2.9 Regulación del metabolismo del TRH en condiciones de balance energético negativo	21
2.10 Regulación del metabolismo del TRH en condiciones de balance energético positivo	22
2.10.1 Antecedentes directos del proyecto	22
3 JUSTIFICACIÓN	25
4 HIPÓTESIS	25
5 OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos particulares	26
6 DIAGRAMAS EXPERIMENTALES	27
6.1 Diagrama experimental del objetivo 1	27
6.2 Diagrama experimental del objetivo 2	28
6.3 Diagrama experimental del objetivo 3	29
7 MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Animales	30
7.2 Protocolo del consumo agudo de DAG en roedores	30
7.2.1 Consumo de DAG y DR por 3 días	30
7.3 Generación de incremento en la concentración de TG en suero en respuesta al consumo de DR o DAG por 4 h en animales ayunados por 14 h durante el período de actividad o alimentados <i>ad libitum</i>	31
7.4 Protocolo de la aplicación intraperitoneal de lipofundin o SSI y consumo de DR o DAG en animales ayunados por 12 h	32
7.5 Protocolo de perfusión vía cardiaca	32
7.6 Obtención de series de cortes de los cerebros de las ratas	33
7.7 Detección de c-Fos por inmunohistoquímica en flotación en cortes de tejido	

	de cerebro perfundido -----	34
	7.7.1 Detección de c-Fos por inmunohistoquímica en cortes de cerebro montados en portaobjetos-----	35
7.8	Protocolo de detección del RNAm del TRH por hibridación <i>in situ</i> -----	35
	7.8.1 Preparación del tejido previamente perfundido -----	35
	7.8.1.1 Preparación de la sonda de cRNA marcada con Digoxigenina-UTP por transcripción <i>in vitro</i> -----	36
	7.8.2 Preparación de la solución de hibridación -----	37
	7.8.3 Condiciones empleadas en la post-hibridación -----	38
7.9	Análisis de las imágenes -----	39
7.10	Controles -----	40
7.11	Disección del área del núcleo paraventricular del cerebro congelado de rata-----	40
7.12	Purificación del RNA total del núcleo paraventricular del hipotálamo empleando un kit de QIAGEN-----	40
7.13	Determinación de la concentración de RNA total obtenido del núcleo paraventricular-----	41
7.14	Reacción de transcripción reversa -----	41
7.15	Reacción de PCR en tiempo real y cuantificación del RNAm-----	42
7.16	Determinación de la concentración de leptina en suero mediante el ensayo de ELISA -----	44
7.17	Determinación de la concentración de ácidos grasos libres mediante el ensayo de ELISA -----	45
7.18	Cuantificación de la concentración de insulina en suero mediante el ensayo de ELISA -----	46
7.19	Determinación de la concentración de corticosterona en suero por Radioinmunoensayo (RIA) ----	47
7.20	Determinación de la concentración de triglicéridos en suero empleando un método enzimático ---	48
7.21	Análisis estadísticos -----	49
8	RESULTADOS-----	50
	8.1 Determinación de la coexpresión de la proteína c-Fos y el RNAm del TRH en el NPV de ratas alimentadas con DR o DAG por 3 días -----	50
	8.1.1 Determinación de la ganancia del peso corporal -----	50
	8.1.2 Consumo de alimento y agua -----	51
	8.1.3 Determinación de la concentración de triglicéridos y la cantidad de grasa blanca epididimal -----	52
	8.2 Efectos del consumo de dietas con diferente aporte calórico sobre el número de neuronas TRHérgicas, la coexpresión del RNAm del TRH y la proteína c-Fos y el número de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo -----	53
	8.2.1 Análisis de la respuesta de las neuronas TRHérgicas a la DAG por 3 días en la cepa Wistar IGS-----	56
	8.3 Efecto del incremento agudo de triglicéridos y ácidos grasos libres en suero sobre la biosíntesis del TRH en el NPV de ratas Wistar Han-----	61
	8.3.1 Efecto de la ingesta de DR y DAG (45%) durante un período de 4 h sobre la concentración de triglicéridos en ratas -----	61
	8.3.1.1 Experimentos preliminares y optimización metodológica -----	61

8.3.1.2	Efecto de la ingesta de DR y DAG (60%) durante un período de 2 o 4 h, sobre el consumo de alimento, la ganancia de peso, la concentración de TG, NEFA, insulina, leptina, glucosa y corticosterona en suero de ratas Wistar-Han -----	62
8.3.1.3	Efecto de la ingesta de DR y DAG (60%) durante un período de 2 o 4 h sobre el nivel del RNAm del TRH en el NPV-----	63
8.4	Efecto de la aplicación intraperitoneal de lipofundin 20% sobre la ganancia de peso, la concentración de NEFA, TG, glucosa, insulina, leptina y corticosterona en suero de ratas -----	65
8.4.1	Efecto de la aplicación intraperitoneal de lipofundin 20% sobre la expresión del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo -----	66
8.5	Análisis del número de neuronas TRHérgicas, la coexpresión del RNAm del TRH y la proteína c-Fos y el número de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo, en respuesta a la inyección de lipofundin (4 h) -----	67
8.5.1	Efectos de la inyección de lipofundin o SSI sobre el peso corporal, la concentración de NEFA, TG, glucosa e insulina en suero-----	67
8.5.2	Análisis de la expresión de c-Fos en las neuronas TRHérgicas del hipotálamo-----	68
9	DISCUSIÓN -----	70
9.1	Efecto del incremento en la concentración de TG o NEFA en la sangre sobre la biosíntesis del TRH en el NPV-----	73
10	CONCLUSIONES -----	78
11	PERSPECTIVAS -----	79
12	BIBLIOGRAFÍA -----	80
13	ANEXOS -----	92
Anexo 1	Preparación de material para trabajar con RNA -----	92
Anexo 2	Purificación del RNA total del núcleo paraventricular del hipotálamo empleando un kit de QIAGEN -----	93
Anexo 3	Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar Han -----	94
Anexo 4	Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a cFos en la cepa Wistar IGS-----	95
Anexo 5	Coeficientes de correlación de Pearson -----	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación de la síntesis y procesamiento del TRH -----	13
Figura 2	Esquema representativo del mecanismo propuesto de la degradación del TRH en la EM y la regulación de la PPII -----	15
Figura 3	Representación gráfica de la integración de señales que regulan centralmente el eje HPT -----	20
Figura 4	Análisis del número de neuronas TRHérgicas y neuronas TRHérgicas positivas a p-STAT3 o p-CREB en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar IGS alimentadas con DR o DAG durante 3 días-----	23
Figura 5	Condiciones de amplificación del RNAm de los genes de TRH, CycA y RPLP0 ----	43
Figura 6	Esquema de reacciones enzimáticas empleadas en el kit para la determinación de la concentración de TG -----	48
Figura 7	Influencia de la dieta sobre la ganancia del peso corporal de ratas que consumieron alimento con diferente cantidad de grasa (3.1 Kcal/g-18% y 4.5 Kcal/g-45%) -----	50
Figura 8	Efecto del consumo de las dietas con diferente aporte calórico y cantidad de grasa sobre la ingesta de alimento y agua -----	51
Figura 9	Efecto del consumo de las dietas sobre la concentración sérica de triglicéridos y la cantidad de grasa blanca epididimal -----	52
Figura 10	Análisis del número de neuronas positivas al RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar Han, alimentadas por tres días con dietas que contienen diferente aporte calórico y grasa -----	53
Figura 11	Cuantificación del porcentaje de neuronas TRHérgicas positivas a la proteína c-Fos y el número total de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar Han alimentadas con dietas que contienen diferente aporte calórico -	55
Figura 12	Análisis del número de neuronas TRHérgicas en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar IGS, alimentadas con dietas que contienen diferente aporte calórico durante 3 días -----	56
Figura 13	Cuantificación del porcentaje de neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y del número total de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar IGS, alimentadas con dietas que contienen diferente aporte calórico -----	58
Figura 14	Curvas de amplificación en la qPCR para los RNAm de TRH, CycA y RPLP0 en el NPV-----	63
Figura 15	Niveles de expresión relativa del RNAm del TRH en el NPV de ratas alimentadas con DAG y DR -----	64
Figura 16	Niveles de expresión relativa del RNAm del TRH en el NPV de ratas tratadas con la inyección intraperitoneal de SSI o lipofundin 20% -----	66
Figura 17	Detección de la proteína c-Fos en rebanadas de cerebro congelado, en respuesta a la aplicación de lipofundin o SSI a las 4 h -----	69

Figura 18	Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar Han -----	94
Figura 19	Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar IGS -----	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Receptores, transportadores y vías de señalización de ácidos grasos -----	10
Tabla 2	Mezcla de reacción para la transcripción reversa -----	41
Tabla 3	Mezcla de reacción para la qPCR -----	42
Tabla 4	Secuencias de oligonucleótidos empleados en los ensayos de la qPCR -----	42
Tabla 5	Comparación del efecto del consumo de las dietas con diferente aporte de grasa durante 3 días, sobre parámetros de interés entre la cepa Wistar-Han y la cepa Wistar IGS-----	60
Tabla 6	Comparación del efecto del consumo de las dietas con diferente aporte de grasa durante 3 días, sobre el número de neuronas TRHérgicas, TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos, entre la cepa Wistar Han y la cepa Wistar IGS -----	60
Tabla 7	Efecto del consumo de DAG (45% grasa) o DR (18% grasa) durante 4 h en ratas macho, previamente ayunadas durante 14 h o alimentadas <i>ad libitum</i> , sobre parámetros físicos y bioquímicos-----	61
Tabla 8	Efecto del consumo de DAG (60%) o DR durante 2 o 4 h en ratas macho, previamente ayunadas durante 12 h, sobre parámetros físicos y bioquímicos-----	62
Tabla 9	Efecto de la aplicación de lipofundin 20% a las 2 y 4 h en ratas macho previamente ayunadas durante 12 h, sobre parámetros físicos y bioquímicos-----	65
Tabla 10	Efecto de la aplicación de lipofundin 20% a las 4 h en ratas macho previamente ayunadas durante 12 h, sobre parámetros físicos y bioquímicos -----	67
Tabla 11	Efecto del consumo de DAG sobre el coeficiente de correlación de Pearson -----	96
Tabla 12	Efecto de la inyección intraperitoneal de SSI y lipofundin sobre el coeficiente de correlación de Pearson -----	96

LISTA DE ABREVIATURAS

- **Adv 36** Adenovirus 36
- **AGRP** Proteína relacionada con la proteína agouti
- **AMPC** Monofosfato de adenosina cíclico
- **α -MSH** Hormona estimulante de los melanocitos
- **BDNF** Factor neurotrófico derivado del cerebro
- **BSA** Albúmina de suero bovino
- **BXR2** Receptor 2 de orexinas
- **CART** Transcrito regulado por anfetamina y cocaína
- **CREB** Proteína de unión al elemento CRE
- **CRF** Factor liberador de corticotropina
- **CycA** Ciclofilina A
- **DAG** Dieta alta en grasa
- **DR** Dieta regular
- **EM** Eminencia media
- **GR** Receptor de glucocorticoides
- **HL** Hipotálamo lateral
- **HPA** Eje hipotálamo-pituitario-adrenal
- **HPT** Eje hipotálamo-pituitario-tiroideo
- **HT** Hormonas tiroideas
- **MCH** Hormona concentradora de melanina
- **MC4R** Receptor 4 de la hormona estimulante de los melanocitos
- **ARC** Núcleo arcuato
- **NDM** Núcleo dorsomedial
- **NPV** Núcleo paraventricular
- **NPVa** Núcleo paraventricular anterior
- **NPVm** Núcleo paraventricular medio
- **NPVp** Núcleo paraventricular posterior
- **NPY** Neuropeptido Y
- **NTS** Núcleo del tracto solitario

- **NVM** Núcleo ventromedial
- **Ob-Rb** Isoforma b del receptor de leptina
- **OMS** Organización Mundial de la Salud
- **PAM** Peptidilglicina alfa monooxigenasa
- **PBS** Solución salina amortiguada por fosfatos
- **PFHL** Región perifornical del hipotálamo lateral
- **POMC** Proopiomelanocortina
- **p-CREB** Proteína fosforilada de unión al elemento de CRE
- **RER** Retículo endoplásmico rugoso
- **RNAm** Ácido ribonucleico mensajero
- **RPLP0** Subunidad del tallo lateral de la proteína ribosómica P0
- **SNC** Sistema nervioso central
- **SS** Solución salina
- **pSTAT3** Transductor de señal y activador de la transcripción fosforilado
- **TA** Temperatura ambiente
- **TG** Trans-Golgi
- **TRH** Hormona liberadora de tirotrópina
- **TSH** Hormona estimulante de la tiroides o Tirotrópina
- **Tyr** Tirosina
- **T3** Triyodotironina
- **T4** Tiroxina

1. INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH por sus siglas en inglés) es un tripéptido (piroGlu-His-Pro-NH₂) sintetizado como un precursor de alto peso molecular, el cual es procesado por varias enzimas para generar el péptido activo. Este neuropéptido transduce su señal en mamíferos a través de 2 receptores acoplados a proteínas G, TRH-R1/TRH-R2, los cuales están diferencialmente distribuidos en el organismo. El TRH en su papel como neurohormona se sintetiza en la región hipofisiotrófica del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, este es secretado de terminales nerviosas localizadas en la eminencia media (EM) hacia los vasos sanguíneos del sistema porta-hipofisario, por medio del cual alcanza sus células blanco en la pituitaria modulando la síntesis y secreción de tirotrópina (TSH) y prolactina (PRL). La tirotrópina secretada al torrente sanguíneo regula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (HT) triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) (Nillni. EA, 2010; Joseph-Bravo. P *et al.*, 2015). Las HT regulan la termogénesis obligatoria y facultativa, y por lo tanto una fracción importante del gasto de energía, así como múltiples procesos durante el desarrollo y la vida adulta (Mullur *et al.*, 2014). Incluyendo un efecto retroalimentador negativo sobre la pituitaria y el NPV inhibiendo la síntesis y liberación de TSH y del TRH (Koller *et al.*, 1987).

Cambios en el estado energético de los organismos modifican la tasa de síntesis y liberación del TRH por las neuronas TRHérgicas del NPV. Por ejemplo, el nivel del RNAm y liberación del TRH se ven reducidas en condiciones de ayuno (Lechan and Fekete, 2006; Boelen *et al.*, 2008). Los neuropéptidos provenientes del núcleo arcuato (ARC) con actividad orexigénica como el neuropéptido Y y la proteína relacionada con la proteína agutí (AGRP), inhiben la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV (Fekete *et al.*, 2002^a; Fekete *et al.*, 2002^b). Mientras que, neuropéptidos anorexigénicos la estimulan, como ocurre con el transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART) y la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH) (Lechan and Fekete, 2006; Joseph-Bravo *et al.*, 2015). En condiciones de balance energético positivo crónico como ocurre en la obesidad inducida por consumo de dieta alta en grasa (DAG), se observa un incremento del nivel del RNAm del TRH, el péptido TRH, y la señalización por STAT3 fosforilado (transductor de señal y activador de la transcripción) en neuronas TRHérgicas del NPV, así como un incremento en la concentración circulante de leptina. Sugiriendo que, la vía directa de la

leptina es la responsable de inducir la biosíntesis del TRH en estas neuronas (Perello *et al.*, 2010; Torres-Reyes, 2014; Ramírez-Bustos, 2018). Por otro lado, en condiciones de cambio agudo y positivo del balance energético, generado por el consumo de DAG durante 3 días, encontramos un aumento significativo en el nivel del RNAm del TRH y el número de neuronas TRHérgicas del NPV, con respecto al grupo que consumió la dieta regular (DR). A diferencia de lo observado en los animales obesos, no encontramos diferencias en el número de neuronas TRHérgicas del NPV positivas al pSTAT3 y/o pCREB, comparando los animales que consumieron la DAG y la DR. Sugiriendo que, en esta condición, la vía indirecta o directa de la leptina no participan en la regulación de la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV (Ramírez *et al.*, 2019).

El consumo agudo de DAG incrementa en sangre la concentración de leptina, insulina, triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres no esterificados (NEFA), los cuales modulan el metabolismo basal y la actividad de neuronas hipotalámicas. Los triglicéridos y ácidos grasos libres no esterificados estimulan la biosíntesis de neuropéptidos en diferentes núcleos del hipotálamo (Akabayashi *et al.*, 1994). Si bien, no es claro el mecanismo por el cual inducen tal efecto. Por otro lado, se sabe que las neuronas hipotalámicas contienen lipasas que pueden degradar a los TG y que los ácidos grasos pueden ser oxidados en las mitocondrias para generar energía. Para demostrar que los TG o NEFA pueden modular la biosíntesis de neuropéptidos en las neuronas hipotalámicas, se empleó en roedores el tratamiento enteral con una emulsión de lípidos (Intralipid 20%; contiene 20% de aceite de soya, 1.2 % de fosfolípidos de yema de huevo y 2.25 de glicerina), que genera incremento rápido de TG y NEFA en suero, sin incrementar la concentración circulante de leptina, insulina o glucosa. Este efecto fue acompañado de un aumento en el nivel de galanina y encefalinas en el NPV, orexinas y encefalinas en la región perifornical del hipotálamo lateral (PFHL), y encefalinas en el ARC (Chang *et al.*, 2004). El efecto sobre los RNA mensajeros de los neuropéptidos provocado por la inyección de intralipid 4 h después del tratamiento, se reproduce en animales a los que se les proporcionó DAG durante 4 h, con respecto a los que consumieron DR. Además, se determinó que la proteína c-Fos (un marcador de la activación neuronal), se incrementó en el área PFHL y en el NPV en respuesta al aumento de TG y/o NEFA, generado en los animales tratados con la aplicación i.p de intralipid 20%, o el consumo de DAG (Chang *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que los TG y/o NEFA pueden

inducir la activación de c-Fos en neuronas y modular la biosíntesis de neuropéptidos en el hipotálamo.

El objetivo de esta tesis consistió en determinar si en ratas macho adultas, los TG o NEFA regulan rápidamente (h) la biosíntesis del TRH y la expresión de c-Fos en las neuronas del NPV, en respuesta al consumo agudo de DAG y a la aplicación de lipofundin 20% (emulsión de grasa compuesta de 10% de aceite de soya y 10 % de triglicéridos de cadena media). Para esto, analizamos la coexpresión de la proteína c-Fos y el RNAm del TRH en el NPV de ratas alimentadas *ad libitum* con DAG (45% de calorías provenientes de la grasa) durante 3 días. Posteriormente se analizó por PCR en tiempo real, el efecto de la inyección intraperitoneal de lipofundin 20% o Solución Salina Isotónica (SSI), así como el consumo de DAG (60% de calorías provenientes de grasa) o DR (18% de calorías provenientes de grasa) por 2 y 4 h, sobre la biosíntesis del TRH en las neuronas del NPV del hipotálamo. Cuantificamos también las concentraciones de leptina, insulina, corticosterona y glucosa en sangre para relacionarlas con la regulación de la biosíntesis del TRH en respuesta al consumo agudo de DAG en la rata macho.

2. ANTECEDENTES

2.1 La obesidad en el mundo y su etiología

La obesidad se define como una enfermedad crónica inflamatoria de bajo grado. De acuerdo con la organización mundial de la salud esta enfermedad se considera como una pandemia que impacta en todos los grupos de edad. Previamente, se reportó que cada año mueren 2.8 millones de personas a causa de esta enfermedad o bien quedan incapacitadas, esto debido a que propicia el desarrollo de diferentes trastornos metabólicos: alteraciones cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II, osteoartritis, algunos tipos de cáncer, apnea obstructiva del sueño y otras alteraciones (Clemmensen *et al.*, 2017; Mohammed *et al.*, 2018). En México, esta enfermedad afecta a más del 30% de la población adulta y se estima que para el 2050 la proporción de hombres y mujeres obesos en el mundo aumentará a 54 y 37% respectivamente (DiBonaventura *et al.*, 2018).

El origen de la obesidad es multifactorial (Hruby y Hu, 2015). Recientemente, se ha dado mucho interés al papel de la microbiota intestinal en modular el peso corporal. Los pacientes obesos presentan menor diversidad en los componentes de la microbiota intestinal, con respecto a los pacientes sanos. Por otro lado, ratones genéticamente obesos presentan un incremento de Firmicutes y una disminución de Bacteroidetes en las heces, independientemente de la dieta que consumen (Sanz *et al.*, 2010). Ratones libres de gérmenes, restituidos con microbiota de ratones o humanos obesos, desarrollan obesidad. Además, se han propuesto diferentes mecanismos que asocian a la microbiota y la obesidad. Uno de ellos muestra que la microbiota intestinal tiene la capacidad de disminuir la oxidación de ácidos grasos en el hígado, mediante la activación de la proteína cinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK), generando como consecuencia acumulación de grasa corporal. También se ha sugerido que la microbiota puede degradar carbohidratos que normalmente los humanos no procesan, incrementando de esta forma el consumo calórico (Al-Assal *et al.*, 2018; Di-Rienzi and Britton, 2020; Arnone *et al.*, 2022). A la fecha no se ha definido claramente su participación en el desarrollo de la obesidad.

Las alteraciones genéticas y epigenéticas también son factores de riesgo que propician el desarrollo de esta enfermedad; ejemplo de estos factores son las mutaciones en genes

involucrados en la regulación de la homeostasis de energía (FTO, MC4R, BDNF, APOA2, POMC, OB, entre otros), así como los mecanismos que afectan la expresión de genes (metilación del DNA, regulación mediada por microRNAs, y modificaciones postraduccionales de histonas). La exposición al estrés durante la gestación o la lactancia, la desnutrición, el consumo excesivo de alimento o disruptores endocrinos, se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar obesidad en la edad adulta (Youngson y Morris, 2013; Pusalkar *et al.*, 2015).

En los últimos años se ha reportado que las infecciones virales pueden estar asociadas con el desarrollo de la obesidad en animales y humanos. El agente infeccioso más relacionado con la obesidad es el adenovirus 36 (Adv 36). Ratas infectadas con Adv 36 presentan un incremento en el peso corporal. En humanos este se asocia con la obesidad en niños y adultos, la prevalencia Adv36 aumenta en relación con el índice de masa corporal. Mediante estudios *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que la proteína E4orf1, es una de las proteínas que media el efecto del Adv 36 incluido su potencial adipogénico, por lo que la infección con este virus debe considerarse como un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad (Ponterio and Gnessi, 2015). En México se ha encontrado una asociación entre niños y adultos con obesidad y la presencia de anticuerpos contra Adv 36 (Parra-Rojas *et al.*, 2013).

Otro factor que claramente tiene un impacto importante en los altos índices de sobrepeso y obesidad en el mundo, son los nuevos estilos de vida, como es el alto grado de estrés, el sedentarismo, el incremento en el consumo de alimentos o bebidas hipercalóricas, alteración en los ritmos sueño-vigilia, entre otros. Estos conducen a un estado de balance energético positivo, que promueve la acumulación de grasa en el organismo y alteración de los mecanismos del control del hambre y saciedad (Ghanemi *et al.*, 2018).

De acuerdo con la OMS, una de las estrategias que a la fecha ha generado mejores resultados para prevenir y revertir esta enfermedad, es adoptar cambios permanentes en el estilo de vida: consumir una dieta equilibrada y realizar actividad física periódica, ya que otras estrategias empleadas como las farmacológicas o quirúrgicas no han podido revertir permanentemente este problema (Brethauer *et al.*, 2006). Sin embargo, debido a que esto resulta muy difícil para la gran mayoría de los individuos y en especial a los que padecen sobrepeso y obesidad, es de suma importancia continuar con la búsqueda de

estrategias que ayuden a contrarrestar la enfermedad, por lo que en los últimos años se han redoblado esfuerzos para tratar de comprender los circuitos y mecanismos moleculares que participan en la regulación de las señales involucradas en el control del hambre, la saciedad y gasto energético.

2.2 Participación de los núcleos y neuropéptidos hipotalámicos en la regulación de la homeostasis energética

El sistema nervioso central (SNC) en conjunto con el sistema endócrino juegan un papel fundamental en la regulación de la homeostasis energética. El hipotálamo es la principal región del cerebro donde se lleva a cabo la integración de señales centrales y periféricas que regulan el metabolismo energético, está conformado por diferentes núcleos celulares que en conjunto participan en dicha regulación, éstos son: El Núcleo Arcuato (ARC), el núcleo dorsomedial (NDM), el núcleo ventromedial (NVM), el hipotálamo lateral (HL) y el núcleo paraventricular (NPV).

El ARC está ubicado en la base del cerebro medio-posterior, a los lados y sobre la EM. Dada su localización, donde la barrera hematoencefálica es en parte laxa y presenta capilares fenestrados que permiten la detección de moléculas de la periferia por los grupos neuronales presentes en el ARC. Por ejemplo, se detectan las variaciones en las concentraciones circulantes de hormonas como: la ghrelina, la insulina, la colecistoquinina y la leptina, entre otras, y de nutrientes como: azúcares, lípidos y aminoácidos, entre otros (Stanley *et al.*, 2005; Kleinridders *et al.*, 2009; Boguszewski and van der Lely, 2015). El ARC también recibe señales de alteraciones metabólicas periféricas por medio del nervio vago vía las neuronas presentes en el núcleo del tracto solitario (NTS), las cuales posteriormente conectan con las neuronas del ARC (Schneeberger *et al.*, 2014). Este núcleo está formado al menos por dos poblaciones principales de neuronas denominadas de primer orden que controlan el apetito y el gasto energético. Una subpoblación coexpresa los neuropéptidos orexigénicos, el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con la proteína agouti (AgRP) en la parte lateral. Mientras, que la otra subpoblación expresa a los neuropéptidos anorexigénicos: la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH), y el transcrito regulado por cocaína y Anfetamina (CART), en la parte media (Fekete and Lechan, 2014). Recientemente, se ha demostrado en el ARC la presencia de neuronas positivas a la nociceptina y el GABA,

que modulan la actividad de las neuronas de α -MSH y favorecen el consumo de dieta rica en grasa (Jais *et al.*, 2020). La expresión y liberación de los neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos en el ARC dependen de los cambios en el estado de energía. En condiciones de balance energético negativo como lo es el ayuno, la expresión de los péptidos orexigénicos se incrementa generando hambre y una atenuación de la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT), asociada con una disminución en la actividad del eje HPT. El AgRP se expresa exclusivamente en el ARC; en la rata, su administración central estimula la ingesta de comida, reduce el gasto de energía y genera obesidad (Small *et al.*, 2003). El CART se encuentra altamente expresado en el cerebro, y en el ARC se sabe que más del 95% de estas neuronas CART positivas coexpresan al α -MSH. La administración intracerebroventricular inhibe la ingesta de comida y estimula la termogénesis en el BAT. La α -MSH es un producto del procesamiento proteolítico del precursor de la proopiomelanocortina (POMC), sus niveles incrementan durante la ingesta de comida y descienden en el ayuno. La administración intracerebroventricular de α -MSH suprime la ingesta de comida y disminuye el peso corporal (Schneeberger *et al.*, 2014). Una vez que las neuronas del ARC reciben señales de la información del estado nutricional del organismo, envían a su vez señales a neuronas denominadas de segundo orden que se encuentran distribuidas en los otros núcleos hipotalámicos y fuera del hipotálamo, que activan mecanismos de control sobre el hambre-saciedad, que repercuten en el comportamiento y el gasto de energía, los cuales participan directamente en la regulación de la homeostasis energética.

El NDM participa en la regulación del ritmo circadiano, el estrés y la termogénesis. Recibe proyecciones del ARC y a su vez envía proyecciones al NPV y al HL. Este núcleo contiene poblaciones de neuronas glutamatérgicas, GABAérgicas y TRHérgicas y expresa receptores para la leptina e insulina (Chou *et al.*, 2003).

El NVM es conocido como el centro de la saciedad; recibe proyecciones de las neuronas de AgRP y POMC localizadas en el ARC, de la amígdala y el HL, y a su vez las neuronas del NVM envían prolongaciones a la zona parvocelular del NPV y a áreas extrahipotalámicas como el tallo cerebral, entre otras. Previamente, se ha reportado que las neuronas de este núcleo expresan abundantemente el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), si bien se ha encontrado también en el HL, el NDM, el ARC y el NPV,

pero en menores densidades. En humanos y ratones la falta de este factor neurotrófico o de su receptor (TrkB) causa hiperfagia y obesidad. Aunado a esto la administración central o periférica de BDNF genera una disminución del peso corporal y de la ingesta de alimento. También se ha demostrado que el nivel de BDNF se incrementa en el NVM a través de la activación del receptor MC4R (Xu *et al.*, 2003; Yeo *et al.*, 2004; Unger *et al.*, 2007).

El HL es conocido como el centro del hambre; participa en la regulación del balance energético, el consumo de alimento y agua, el estado de alerta, entre otras funciones. Este núcleo contiene neuronas que expresan el TRH y poblaciones neuronales orexigénicas que sintetizan a las orexinas A y B, la hormona concentradora de melanina (MCH), el ácido γ -aminobutírico (GABA) y el glutamato, entre otras. La expresión de las orexinas y la MCH se incrementa durante condiciones de balance energético negativo. En ratas, la administración i.c.v de orexinas incrementa la ingesta de comida, mientras, que las lesiones bilaterales en este núcleo dan como resultado una pérdida del peso corporal (Dube *et al.*, 1999; González *et al.*, 2016). Las neuronas de este núcleo son inervadas por terminales nerviosas provenientes del ARC, y a su vez las neuronas de esta región proyectan al ARC, NTS, NPV, entre otros. En ratas se reportó, que el receptor 2 de orexinas (OXR2) se expresa en la división parvocelular del NPV y que la inyección i.c.v de orexina A inhibe la liberación del TRH y la concentración de TSH en plasma, mientras que la administración central de orexina B incrementa las concentraciones circulantes de TSH (Marcus *et al.*, 2001).

El NPV se encuentra localizado en el hipotálamo medio, al lado de la parte superior del tercer ventrículo. El NPV se divide en dos regiones principales y cada una de ellas alberga grupos de neuronas funcionalmente distintas: 1) La división magnocelular, en la que se encuentran gran número de neuronas que sintetizan vasopresina y oxitocina, las cuales envían sus prolongaciones a la hipófisis posterior, sitio donde se liberan los péptidos a la circulación, regulando la conducta reproductiva, la presión arterial y el equilibrio de líquidos. 2) La división parvocelular, a su vez se subdivide en base a su localización rostro-caudal en tres regiones: anterior, media y posterior. En esta división se encuentran poblaciones neuronales que expresan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), al TRH, las encefalinas, la dinorfina, entre otras. Algunas de las neuronas CRHérgicas y

TRHérgicas parvocelulares de la región media y posterior se denominan hipofisiotrópicas ya que envían sus proyecciones a la EM y participan en la regulación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y del eje HPT (Fekete and Lechan, 2014). En lo que respecta a las neuronas TRHérgicas del NPV anterior (NPVa), se ha sugerido que en roedores participan en la regulación de la conducta alimentaria ya que reciben inervaciones de núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación de la ingesta de alimento, como lo son: el ARC, NDM, núcleo preóptico medial, el núcleo premamilar ventral, entre otros. A su vez, estas neuronas proyectan al ARC, NDM, NVM, entre otros (Wittmann *et al.*, 2009). El NPV es un centro integrador de proyecciones neuronales provenientes del ARC (NPY/AGRP y α -MSH/CART), del HL (MCH y orexinas), del NVM, del NDM y del tallo cerebral, entre otros. Estas entradas neuronales modulan la biosíntesis del RNAm del TRH y CRH en este núcleo (Nillni, 2010).

2.3 Señalización de lípidos a nivel hipotalámico

Desde hace varios años se ha demostrado la existencia de señales provenientes de la periferia, que actúan sobre el sistema nervioso central, modulando el hambre y la saciedad, y/o el gasto de energía, estableciendo un balance energético que permite además mantener un peso corporal y una cantidad de grasa corporal estables a largo plazo, cuando las condiciones lo permiten (Lenard and Berthoud, 2008). Dentro de estas señales periféricas tenemos a las de acción rápida como lo son los carbohidratos y las de acción lenta como ocurre con los lípidos. Los ácidos grasos provenientes de la dieta o del tejido adiposo, modulan el consumo de alimento, el gasto de energía y el metabolismo de la glucosa (Nakamura *et al.*, 2014; Zhao, 2022). Estos son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica 1) a través del mecanismo reversible de Flip-flop, 2) por difusión simple, 3) mediante difusión facilitada empleando las proteínas de unión a los ácidos grasos (FABP1 y FABP4), o bien 4) mediante la unión a transportadores específicos como la translocasa CD36, para posteriormente entrar a las neuronas (Chudoba *et al.*, 2019). Aunado a esto, se sabe que el RNAm de las lipoproteinlipasas (LPL) se expresa en el sistema nervioso, incluyendo en las neuronas y que los ácidos grasos hacen blanco en el ARC, NVM y NPV, además estas neuronas expresan a FABP1, CD36 y FABP3. Dependiendo de la longitud de los ácidos grasos y del grado de

saturación en su cadena de carbonos, estos son capaces de unirse a receptores o transportadores y activar diferentes vías de señalización (Tabla 1)

Tabla 1. Receptores, transportadores y vías de señalización de ácidos grasos.

	Número de carbonos	Receptor o transportador	Vías de señalización	Referencia
Ácidos grasos de cadena larga				
Palmítico (saturado)	C16	GPR40 y GPR120 CD36 y FATP TLR-4	GPR40 y GPR120 activan a la proteína Gq, que a su vez activa a PLC, generando incremento en los niveles de Ca ²⁺ intracelular mediante la IP3. Además, activa las vías de ERK 1/2 por medio de la DAG y la PKC. GPR120, adicionalmente activa a AKT y PKB por medio de PI3K. Activa las vías de señalización de JNK y ERK. Activa la vía de JNK y IKKβ/NFκB.	(Sundaresan y Abumrad, 2015; Kimura <i>et al.</i> , 2020). (Mitchell <i>et al.</i> , 2011; Sundaresan y Abumrad, 2015; Tse <i>et al.</i> , 2017 ^b). (Tse <i>et al.</i> , 2017 ^b ; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).
Mirístico (saturado)	C14	GPR40, GPR120 y CD36		(Mitchell <i>et al.</i> , 2011; Tse <i>et al.</i> , 2017 ^b).
Esteárico (saturado)	C18	GPR40		(Tse <i>et al.</i> , 2017 ^b ; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).
Oléico (monoinsaturado)	C18:1 (9)	GPR40, GPR120, CD36 y FATP1		Mitchell <i>et al.</i> , 2011; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).
Linoléico (poliinsaturado)	C18:2 (6)	GPR40, GPR120 y CD36		(Tse <i>et al.</i> , 2017 ^b ; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).
Alfa-Linolénico (poliinsaturado)	C18:3 (3)			
Araquidónico (poliinsaturado)	C20:4 (6)	GPR40 y TLR4		(Tse <i>et al.</i> , 2017; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).
Ácidos grasos de cadena media				
Caprílico (saturado)	C8	GPR40		Mitchell <i>et al.</i> , 2011; Tse <i>et al.</i> , 2017 ^b ; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).
Cáprico (saturado)	C10			
Láurico (saturado)	C12			
Ácidos grasos de cadena corta				
Ácido butírico		GPR41, GPR43 y MCTs	GPR43 puede activar a la proteína Gi, generando una disminución en los niveles de AMPc y activando la vía de ERK. Por otro lado, también puede activar a la proteína Gq.	(Kimura <i>et al.</i> , 2020; Chodoba <i>et al.</i> , 2019).

Por otro lado, en el NPV, ARC y NVM se encuentran niveles altos de enzimas que participan en la regulación del metabolismo de lípidos, como: la acetil CoA carboxilasa, la carnitina palmitoiltransferasa 1, la ácido graso sintasa, la malonil CoA descarboxilasa, entre otras (Bruce *et al.*, 2017; Chudoba *et al.*, 2019). El malonil CoA inhibe a la carnitina aciltransferasa I y la inhibición del ácido graso sintasa en el cerebro, incrementa los niveles de malonil CoA y reduce la ingesta de comida. La leptina también regula el metabolismo de los ácidos grasos, la inyección central de esta hormona incrementa la actividad de la acetil CoA carboxilasa en el ARC y el NPV mediante la inhibición de la AMPK, generando como respuesta una disminución de los neuropéptidos orexigénicos (NPY/AGRP) y en consecuencia una baja en la ingesta de alimento (Diéguez *et al.*, 2011). En animales obesos alimentados con DAG, los niveles de ácidos grasos saturados en el cerebro se incrementan y al oxidarse en el hipotálamo aumenta la síntesis de ceramidas, moléculas que intervienen con la señalización de la insulina y la leptina, provocando mayor ganancia de peso al generar intolerancia a la glucosa, resistencia a la leptina y a la insulina y disfunción mitocondrial por incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Sergi and Williams, 2020; Reginato *et al.*, 2021).

2.4 La hormona liberadora de tirotrópina

La hormona liberadora de tirotrópina es un tripéptido (L-piroglutamil-L-Histidil-Prolinamida) involucrado en diferentes actividades biológicas, como neurohormona, como anorexigénico y orexigénico, en la conducta locomotora, como modulador de la ansiedad, etc. Esta se sintetiza como un precursor de alto peso molecular, que se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones del sistema nervioso central y en menor cantidad en diferentes órganos. En el hipotálamo se detecta en los núcleos: HL, NDM, NVM, el NPV, el supraóptico, anterior, periventricular, posterior, y en diferentes núcleos del área preóptica. En los mamíferos, la acción del TRH es mediada por su interacción con los receptores de membrana TRH-R1 y TRH-R2, que son acoplados a proteínas G y se encuentran diferencialmente distribuidos en el SNC. El RNAm del TRH-R1 se localiza en el ARC, HL, NDM, la adenohipófisis y el NPV. Mientras que el RNAm del TRH-R2 se encuentra mayoritariamente distribuido en el SNC, por ejemplo: en el tálamo, el córtex cerebral, etc (Heuer *et al.*, 2000). El metabolismo del TRH se regula en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas, como son la lactancia, la exposición al

frío, durante el ciclo luz-oscuridad, el estrés, ayuno, obesidad, endotoxemia, etc (Joseph-Bravo *et al.*, 2015).

2.5 Biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina

En todos los organismos, el gen del preproTRH está constituido por 3 exones y dos intrones. En la rata el tamaño de los intrones es de 750 y 450 pb. El primer exón codifica para la región no traducida 5´ del RNAm, el segundo exón codifica el péptido señal y una porción del extremo amino terminal del péptido de proTRH, mientras que el tercer exón codifica para la parte restante del péptido amino-terminal, 5 copias de la secuencia de TRH separadas por secuencias de péptidos no TRHérgicos, y el péptido carboxilo terminal seguido de la región 3´ no traducida del RNAm. El promotor de este gen contiene una caja TATA de 28 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Por otro lado, se han identificado elementos regulatorios en el promotor proximal del gen: elementos de respuesta a hormonas tiroideas, glucocorticoides, cAMP, al complejo c-Fos y c-Jun, al factor 4 Kruppel-like y al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Fekete and Lechan, 2014).

La síntesis inicia con la generación de un transcrito primario (RNA heteronuclear) en el núcleo; este transcrito sufre una serie de modificaciones como la adición de un casquete metilado en el extremo 5´, una secuencia de poli (A) en el extremo 3´ y el proceso de splicing mediante la intervención de los RNA nucleares pequeños (RNAsn). El RNA maduro sale del núcleo a los ribosomas que se encuentran cercanos al retículo endoplasmático rugoso (RER), en los cuales se realiza la traducción. El péptido señal dirige la translocación cotraduccional del preproTRH hacia el lumen del RER, e inmediatamente es removido generando el proTRH. Este viaja del RER en vesículas al aparato de Golgi y posteriormente al *trans*-Golgi, sitio donde las enzimas convertasas (PC1/PC3 y/o PC2) realizan el primer corte entre los aminoácidos básicos que flanquean a cada molécula de proTRH, los aminoácidos básicos restantes del extremo C terminal (Arg o Lys), son removidos por la carboxipeptidasa E/D (CPE/CPD). Al salir del *trans*-Golgi, los péptidos generados son empaquetados junto con las enzimas de procesamiento final en vesículas de secreción, las cuales viajan a través del axón hasta el sitio de liberación. En el caso de las neuronas hipofisiotrópicas del NPV, esta región es la EM. Durante las últimas etapas de procesamiento, el residuo de Gly del extremo

carboxilo terminal del proTRH es modificado por la enzima peptidilglicina alfa-amida monoxigenasa (PAM), la cual hidroliza a la Gly y deja un grupo amido en el extremo carboxilo terminal. Finalmente, la piroglutamil ciclasa, cicla al residuo de Glu del extremo amino terminal generando un grupo piroglu y en consecuencia el péptido TRH biológicamente activo (Figura 1), (Nillni, 2010; Fekete and Lechan, 2014; Joseph-Bravo *et al.*, 2015).

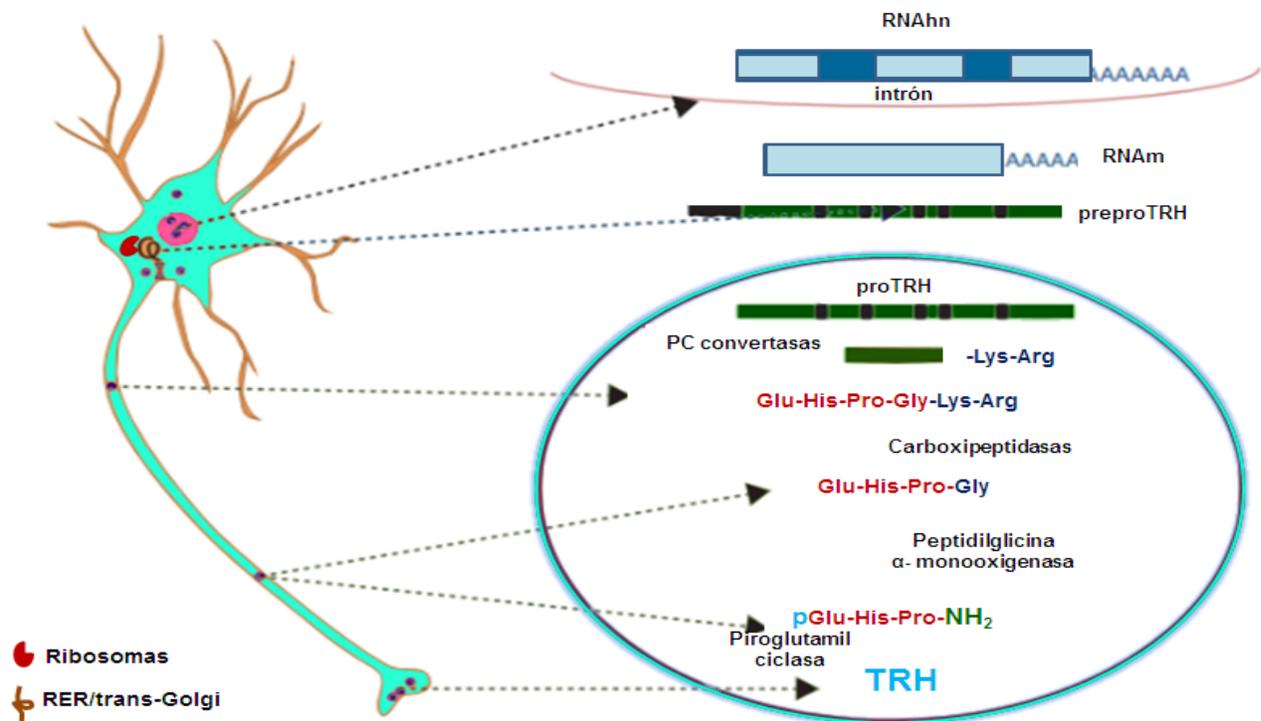


Figura 1. Representación de la síntesis y procesamiento del TRH. El transcrito primario sintetizado en el núcleo sufre una serie de modificaciones antes de ser transportado a los ribosomas que se localizan cerca del RER en el citoplasma, sitio donde se realiza la traducción. El preproTRH se transloca al lumen del RER, lugar donde el péptido señal es eliminado originando el proTRH, que viaja al *trans*-Golgi donde las convertasas realizan el primer corte entre los aminoácidos básicos que flanquean a cada molécula de proTRH; en seguida, las carboxipeptidasas retiran a estos aminoácidos. El proTRH es empaquetado en vesículas de secreción junto con enzimas de procesamiento final y transportado a través del axón hasta el sitio de liberación, generando el péptido activo (modificado de Joseph-Bravo *et al.*, 2015).

2.6 Degradación de la hormona liberadora de tirotropina

El TRH es inactivado en el espacio extracelular por una enzima con una alta especificidad. La piroglutamil peptidasa II (PPII) es una proteína integral de membrana tipo II, que forma parte de la familia de las aminopeptidasas M1. Esta ectoenzima está constituida por un pequeño dominio N-terminal en la región intracelular, un dominio intermembrana y un largo dominio extracelular que contiene el sitio activo de la enzima: una secuencia consenso de unión a Zinc (Schauder *et al.*, 1994). Existe una isoforma soluble de la PPII en el suero denominada tiroliberinasa que se sintetiza en el hígado. En el hipotálamo la PPII es sintetizada en las neuronas de los diferentes núcleos y en los tanicitos, células gliales especializadas, localizadas en la región ventrolateral y sobre la base del tercer ventrículo (Schmitmeier *et al.*, 2002). Se propone que la función principal de esta ectoenzima en los tanicitos consiste en inactivar a la TRH secretada por las terminales nerviosas de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas (Figura 2). Algunas terminales nerviosas de estas neuronas TRHérgicas, se encuentran en contacto con las proyecciones citoplasmáticas de los tanicitos β 2. La inhibición de la actividad de la PPII *ex vivo*, incrementa la cantidad de TRH liberada, apoyando el papel de la PPII como modulador del nivel del TRH en el espacio extracelular (Charli *et al.*, 1998).

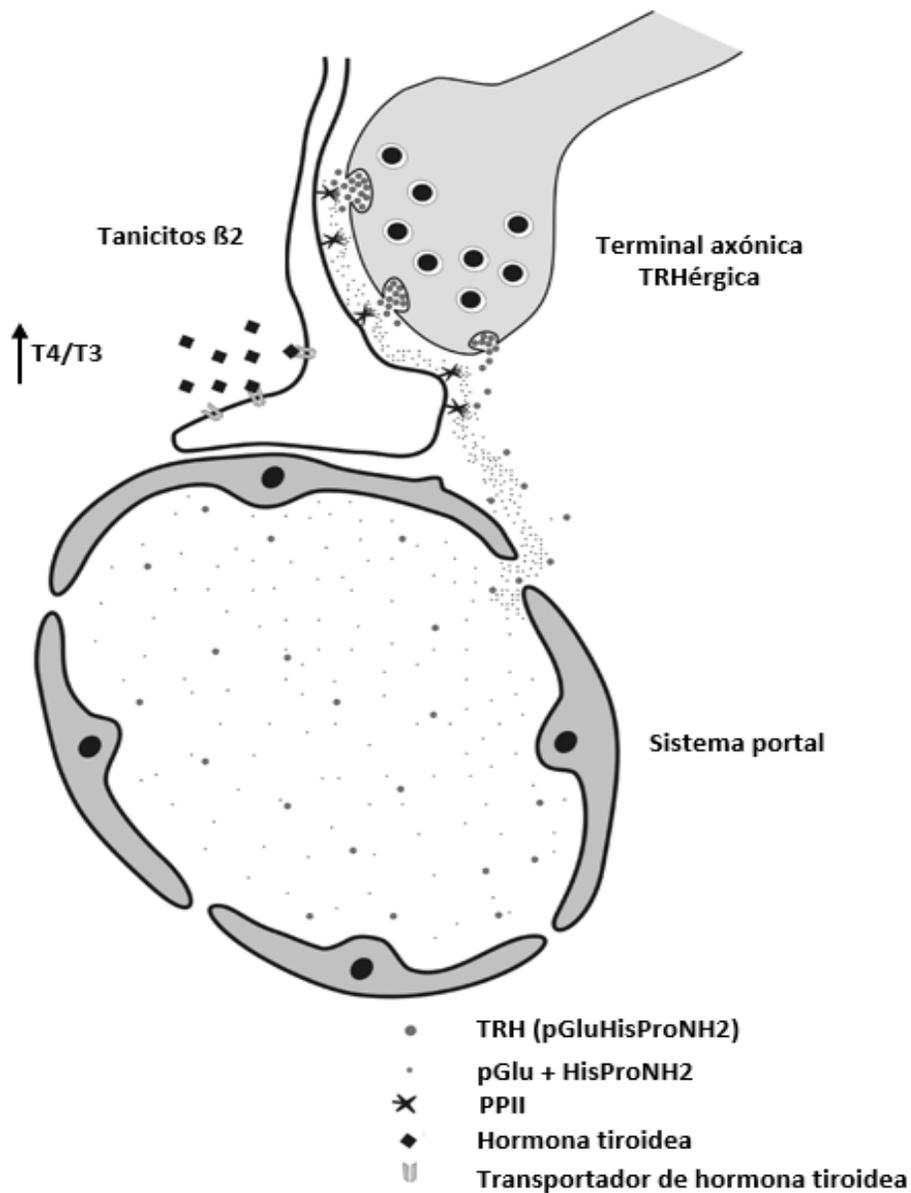


Figura 2. Esquema representativo del mecanismo propuesto de la degradación del TRH en la EM y la regulación de la PPII. Las terminaciones de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas en la EM, se encuentran en contacto con las prolongaciones citoplasmáticas de los tanicitos β_2 , los cuales expresan en su membrana a la metalopeptidasa PPII, esta ectoenzima degrada al TRH produciendo dos productos que no poseen afinidad para los receptores del TRH. Los niveles de PPII son regulados positivamente por la concentración de HT, generando incremento de la actividad de la PPII, lo que puede disminuir la cantidad extracelular de TRH y en consecuencia la secreción de TSH (modificada de Sánchez *et al.*, 2009).

2.7 Papel del TRH en el eje Hipotálamo-Pituitario-Tiroides

Como se mencionó anteriormente, las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas localizadas en la región parvocelular del NPV, envían sus prolongaciones hacia la EM. En este sitio el TRH es liberado al sistema porta hipofisario para posteriormente llegar a sus células blanco en la adenohipófisis y unirse a sus receptores TRH-R1 sobre los tirotrópos y lactotrópos, donde induce la síntesis y liberación de tirotrópinga y prolactina respectivamente (Figura 3). La TSH es transportada por la circulación sistémica hasta la glándula tiroides, sitio donde se une a sus receptores acoplados a proteínas G, generando como respuesta la activación de la adenilato ciclasa, cuyo producto (cAMP) regula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas (HT): Tiroxina (T4) y Triyodotironina (T3). Esta última es la hormona biológicamente activa y es secretada en menor cantidad que la T4. Estas hormonas tienen múltiples órganos blancos como: el hígado, el músculo, el corazón, el tejido adiposo pardo (BAT), el cerebro, entre otros. Ambas hormonas entran a las células mediante un transporte facilitado por medio de transportadores de membrana que se encuentran diferencialmente localizados: el transportador de monocarboxilatos 8 (MCT8, preferencialmente expresado en neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas y tanicitos, con una alta afinidad por T3); el transportador 1 de aniones orgánicos (OATP1C1, expresado en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del cerebro, con una alta afinidad por T4 y T3); el transportador de aniones orgánicos dependiente de Na⁺ (NTCP) y los transportadores heterodiméricos de aminoácidos (HAT). La T4 es transformada a T3 dentro de las células, mediante un proceso de desyodación que involucra la participación de las deiodinasas D1 o D2 (Bianco and Kim, 2006). Las hormonas tiroideas participan en la regulación del metabolismo basal (absorción de nutrientes y respiración celular) y modulan de forma sinérgica con el sistema nervioso simpático (SNS) la termogénesis en el BAT, donde la T3 induce la expresión de la proteína mitocondrial UCP-1 (Uncoupling protein 1, localizada en la membrana mitocondrial interna), la cual desacopla el flujo de electrones de la fosforilación oxidativa, produciendo calor y promoviendo el gasto energético mediante la lipólisis (López *et al.*, 2013).

2.8 Regulación de la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina del NPV

La T3 regula negativamente la actividad del eje HPT observándose disminución en los niveles del RNAm del TRH en el NPV y en las concentraciones del TRH en el sistema portal y la TSH circulante en el hipertiroidismo (Fekete and Lechan, 2007). La síntesis local de T3 en la EM generada por la desyodación de T4, realizada por la deiodinasa 2 presente en los tanicitos $\beta 2$, puede ejercer un efecto negativo sobre la síntesis del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo, sin que la concentración de HT circulante se modifique e incluso disminuyan, esto debido a que la T3 generada por los tanicitos es tomada por el transportador MCT8 que se expresa en las terminales nerviosas de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas en la EM, siendo esta transportada al núcleo de las células (Fekete and Lechan, 2014; Joseph-Bravo *et al.*, 2015).

En la rata, el hipotiroidismo induce un incremento de la biosíntesis del RNAm del TRH en las neuronas parvocelulares a nivel del NPV medio (NPVm), así como en la liberación del TRH en la EM (Segerson *et al.*, 1987; Rondeel *et al.*, 1992).

Por otro lado, los glucocorticoides regulan negativamente la expresión del RNAm de la hormona liberadora de tirotrópina. En ratas adrenalectomizadas, se observó que el nivel del RNAm del TRH del NPV se incrementó, efecto que es revertido al restituir los glucocorticoides (Kakucska *et al.*, 1995). Por otra parte, estudios en cultivos primarios de hipotálamo fetal mostraron que el tratamiento con dexametasona (un glucocorticoide sintético) ejerce efectos diferenciales sobre la biosíntesis del RNAm del TRH. La concentración de 1×10^{-10} M de dexametasona con un tiempo de exposición de 1-3 h, generó disminución en el nivel del RNAm del TRH. Mientras, que concentraciones de 1×10^{-8} y 1×10^{-6} incrementaron el nivel del RNAm del TRH (Pérez-Martínez *et al.*, 1998). Estos resultados sugieren que los glucocorticoides podrían estar regulando de manera diferencial la biosíntesis del TRH. El efecto de represión del RNAm del TRH esta mediado por la interacción del receptor de glucocorticoides con su región blanco en el promotor del gene de TRH o la interacción del receptor con la via de señalización de la PKA (Sotelo-Rivera *et al.*, 2014).

La administración central de NPY en la rata, inhibe la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV y disminuye los niveles de α -MSH en el ARC. Este efecto es causado por la

interacción de NPY con sus receptores Y1 y Y5 (Sarkar and Lechan, 2003). Además, la administración central de AgRP disminuye la concentración circulante de hormonas tiroideas (T3 y T4) y los niveles del RNAm del TRH en el NPV (Fekete *et al.*, 2002^a). Por otro lado, en cultivos primarios de hipotálamo fetal y neonatal con la neurotrofina BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) incrementa el nivel del RNAm del TRH; este aumento es mediado por la activación del TrKB (receptor de tirosina quinasa neurotrófica) detectado en las neuronas TRHérgicas del NPV (Guerra-Crespo *et al.*, 2001; Ubieta *et al.*, 2007).

La α -MSH proveniente del ARC regula positivamente la expresión del RNAm del TRH en el NPV, mediante la activación del receptor MC4R que se encuentra acoplado a una proteína Gs, que desencadena la cascada de señalización que induce la fosforilación de CREB y su posterior unión al elemento CRE del promotor del gen de TRH. En ratas, la administración i.c.v de α -MSH revierte la disminución del RNAm del TRH en el NPV, causada por un estado de ayuno (Nillni, 2010). Por otro lado, se sabe que las neuronas de TRH del NPV son invadidas por neuronas que sintetizan norepinefrina, provenientes del tallo cerebral (Toni and Lechan, 1993). Estudios *in vitro* en cultivos primarios de células hipotalámicas fetales, mostraron que la incubación con noradrenalina (NA), incrementa el nivel basal del RNAm del TRH (Joseph-Bravo *et al.*, 2006). La inyección i.c.v de noradrenalina, induce un incremento en el nivel del RNAm del TRH en el NPV después de 1 h de aplicación (Trujillo-Alonso, 2001). Por otra parte, se ha mostrado que la leptina regula positivamente la expresión del RNAm del TRH a nivel del NPV, y su aplicación revierte la disminución en el nivel del RNAm del TRH generado durante el ayuno (Gou *et al.*, 2004).

Adicionalmente, se ha reportado que el AgRP actúa como un antagonista competitivo o un agonista inverso, sobre los receptores de la melanocortina y bloquea el efecto inducido por la α -MSH sobre la liberación del TRH (Fekete *et al.*, 2002^b; Kim *et al.*, 2000; Fekete *et al.*, 2004).

Por otro lado, sabemos que c-Fos es un gen de expresión temprana inmediata, el cual es utilizado como un marcador de la activación neuronal (Hoffman *et al.*, 1993). Este gen puede ser inducido por diferentes estímulos como lo son: neurotransmisores, factores del crecimiento, interferones, interleucinas, lípidos, entre otros. Por lo cual, es claro que la

activación del gen de c-Fos, es modulado por diferentes vías de señalización como, por ejemplo, la activación de la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), las proteínas de unión al elemento CRE (CREB), Jak 1, 2 y 3, la tirosin cinasa 2 (Tyk 2), p53, la calmodulina proteína cinasa II (CaMKII) y la proteína cinasa A (PKA) (Cruz-Mendoza *et al.*, 2022). Los miembros de la familia de proteínas c-Fos dimerizan con la proteína c-Jun para formar el factor de transcripción AP-1, elemento regulatorio presente en el promotor de diferentes genes, siendo el gen de TRH uno de ellos (Curran *et al.*, 1995; Fekete y Lechan, 2014; Cruz-Mendoza *et al.*, 2022). Previamente se ha reportado que, en cultivos primarios de células hipotalámicas de rata, los ésteres de phorbol estimulan la expresión del RNAm de la hormona liberadora de tirotropina desde la primer hora de tratamiento, y se sugiere que este efecto podría estar mediado por AP-1 (Uribe *et al.*, 1995). Además, el 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate puede inducir la fosforilación de cFos de manera independiente a la proteína cinasa C en cultivos celulares (Barber y Verma, 1987). Por otro lado, hemos demostrado en la rata que la exposición por 1 h a 4° C incrementa la expresión de c-Fos en las neuronas TRHérgicas del NPV (Sánchez *et al.*, 2001).

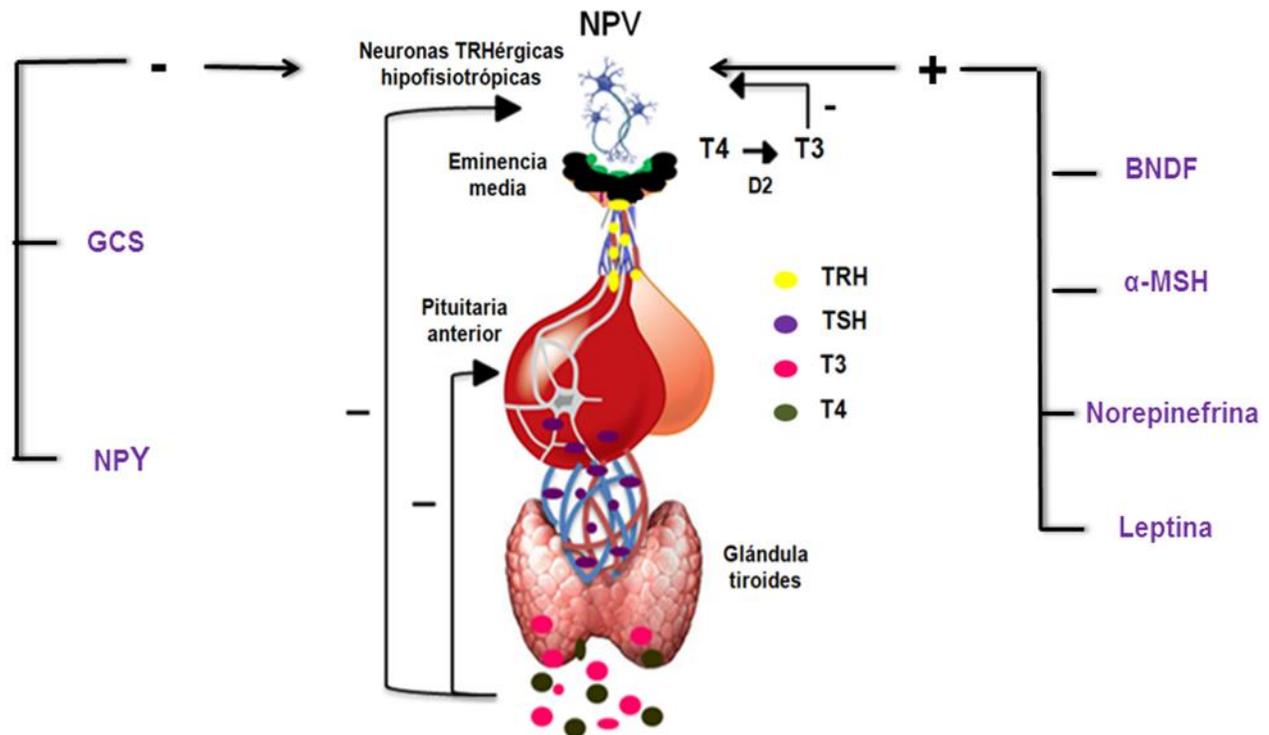


Figura 3. Representación gráfica de la integración de señales que regulan centralmente el eje HPT. Las neuronas hipofisiotrópicas del NPV, envían sus prolongaciones hacia la EM, lugar donde el TRH es liberado para posteriormente inducir la síntesis y liberación de la TSH en la pituitaria, que estimula a la síntesis de las HT (T3 y T4); las HT ejercen retroalimentación negativa sobre el NPV y la pituitaria, inhibiendo la síntesis y liberación del TRH y de la TSH. Otras hormonas y neuropéptidos regulan negativamente la expresión del RNAm del TRH en esta región, como lo son: los glucocorticoides (GCS), el AgRP y el NPY. Mientras que el BDNF, el α -MSH, la norepinefrina y la leptina regulan positivamente la expresión del RNAm del TRH en el NPV.

2.9 Regulación del metabolismo del TRH en condiciones de balance energético negativo

Cuando se establece un balance energético negativo en el organismo como ocurre en el ayuno, la restricción de alimento o el período de lactancia en la madre, se inhibe la actividad del eje HPT, observándose que las concentraciones circulantes de TSH, HT y el nivel del RNAm del TRH en el NPV se ven disminuidos, mientras que el eje HPA se activa incrementando la concentración de corticosterona en (o cortisol en humanos) circulante. La corticosterona podría ser una de las moléculas responsables de generar la disminución en el nivel del RNAm del TRH en el NPV de ratas ayunadas ya que, al bloquear el incremento de este glucocorticoide en respuesta al ayuno, el efecto sobre el nivel del RNAm del TRH se revierte parcialmente (van Hastereen *et al.*, 1995). Por otro lado, las concentraciones séricas de leptina se encuentran disminuidas en esta condición, evento que estimula a las neuronas que expresan el NPY/AgRP, e inhibe a las neuronas de α -MSH en el ARC. Generando como respuesta una disminución en los niveles de expresión del RNAm del TRH en el NPV (Fekete and Lechan, 2014; Zhou and Rui, 2013). La aplicación de leptina exógena en ratones previamente ayunados restituye los niveles del RNAm del TRH en el NPV y parcialmente la TSH circulante (Gou *et al.*, 2004).

En condiciones de ayuno, se ha propuesto que la restitución de leptina activa la expresión del RNAm del TRH en el NPV mediante dos vías independientes: 1) la vía directa, en la cual la leptina se une a la isoforma Ob-Rb de su receptor en las neuronas TRHérgicas del NPV; esta unión desencadena la activación de la vía de señalización de las JAK2/STAT3 que genera como respuesta final la fosforilación de las proteínas STAT3, su posterior dimerización y translocación al núcleo, donde se unen al elemento de respuesta STAT3 en el promotor del gen del TRH. 2) La vía indirecta, en la cual esta adipocina se une a los receptores Ob-Rb que se encuentran localizados en las neuronas que expresan a la α -MSH en el ARC; consecuentemente estas neuronas estimulan a las neuronas TRHérgicas del NPV a través del receptor MC4R (Nillni, 2010). Además, en condiciones de ayuno la actividad de la deiodinasa 2 en los tanicitos aumenta, provocando un incremento en la concentración de T3 local, lo que puede contribuir a inhibir la expresión del RNAm del TRH en el NPV en esta condición (Copala *et al.*, 2005).

2.10 Regulación del metabolismo del TRH en condiciones de balance energético positivo

La obesidad inducida por ingestión de DAG, durante períodos largos de tiempo (4, 8 o 12 semanas de consumo de alimento) en ratas macho adultas, aumenta la expresión del RNAm del TRH, del péptido TRH y la señalización de pSTAT3 en las neuronas TRHérgicas del NPV, con efecto controversial sobre la concentración circulante de tirotrópina, T3 y T4. Este incremento correlaciona con un aumento en la concentración de leptina circulante, por lo que se ha sugerido que en ratas obesas la señalización directa de la leptina sobre las neuronas TRHérgicas del NPV es la responsable de incrementar la biosíntesis del RNAm del TRH en esta condición (Araujo *et al.*, 2010; Perello *et al.*, 2010; Ramírez-Bustos, 2018).

2.10.1 Antecedentes directos del proyecto

En condiciones de balance energético positivo generado por el consumo de DAG (45% de calorías provenientes de grasa) por períodos cortos de tiempo (3 días), provoca al igual que la inducción de obesidad, un incremento significativo en la concentración de leptina en suero, en el nivel del RNAm del TRH en el NPV, así como en el número de neuronas TRHérgicas, con respecto al grupo alimentado con DR (Figura 4A). Por otro lado, no se muestran cambios significativos en las concentraciones de tirotrópina, T3, T4 y corticosterona circulante. El número de neuronas TRHérgicas positivas a pSTAT3 o pCREB es similar en los grupos alimentados con DAG o DR (Figura 4B y C) (Ramírez-Bustos *et al.*, 2019). Estos resultados apoyan que a los 3 días de consumo de DAG la leptina no participa en la regulación de la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV, a través de la vía directa (pSTAT3) o indirecta (PCREB). Lo que sugiere que existen otras vías y/o moléculas que regulan la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV, en respuesta al consumo agudo de DAG.

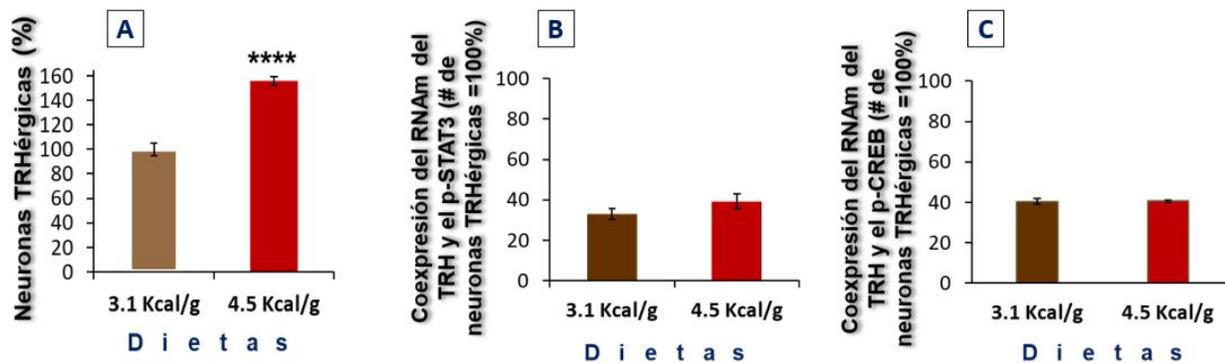


Figura 4. Análisis del número de neuronas TRHérgicas y neuronas TRHérgicas positivas a p-STAT3 o p-CREB en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar IGS alimentadas con DR o DAG durante 3 días. Los histogramas representan al promedio \pm ESM del número de neuronas TRHérgicas (A), TRHérgicas positivas a p-STAT3 (B) y TRHérgicas positivas a p-CREB (C) en el NPV total. La significancia estadística se indica en las gráficas, **** $p < 0.01$. Se analizaron 4 o 5 animales por grupo (Ramírez-Bustos *et al.*, 2019).

El consumo de DAG (50% de calorías provenientes de grasa) por diferentes tiempos (15 min, 1 h, 1 día y 1 semana), en ratas genera un aumento en el nivel de encefalinas y dinorfina en el NPV del hipotálamo, incremento acompañado por una elevación en la concentración de TG en suero a los diferentes tiempos analizados. Además, se observa un incremento en la concentración de leptina en suero después de un día y una semana de consumo de DAG, no se encuentran cambios significativos en la concentración de insulina a los tiempos analizados, con respecto al grupo tratado con la DR (10% de calorías provenientes de grasa), (Chang *et al.*, 2007). Aunado a esto también se sabe que el consumo de DAG durante 4 h induce un aumento en la concentración de TG y NEFA, así como un incremento en el nivel de galanina y encefalinas en el NPV, de orexinas y encefalinas en el área PFHL, con una disminución significativa en la concentración de leptina e insulina en suero, con respecto al grupo de ratas que fue alimentado con la DR (Chang *et al.*, 2004). La asociación entre la concentración de TG y la expresión de estos neuropéptidos hipotalámicos fue demostrada en un estudio en el cual se empleó una inyección intraperitoneal de intralipid 20% vs la aplicación de SSI. La administración de esta emulsión de grasa incrementa significativamente la concentración de TG y NEFA, a las 2 y 4 h de la aplicación. Este aumento es acompañado de un incremento en el nivel de galanina y encefalinas en el NPV, y de orexinas y encefalinas en el área PFHL, como en los animales que consumen DAG durante 4 h. El incremento en la concentración de TG y NEFA correlaciona con un mayor número de células positivas

a c-Fos en el NPV y el área PF del HL a las 4 h de tratamiento. No se encuentran cambios significativos con la aplicación de intralipid en la concentración de glucosa, insulina y leptina en suero, con respecto a los grupos de animales tratados con la SSI (Chang *et al.*, 2004).

Estos resultados sugieren que los lípidos regulan la biosíntesis de neuropéptidos y la expresión de c-Fos en el NPV del hipotálamo de acuerdo con la duración de su ingesta, por lo que proponemos que los NEFA o los TG pudieran modificar rápidamente la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV en respuesta al consumo agudo de DAG.

3. JUSTIFICACIÓN

Las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo juegan un papel importante en el control del metabolismo basal, y parecen ajustar su actividad metabólica para contribuir en el mantenimiento de la homeostasis energética. Definir las señales extracelulares responsables de regular la biosíntesis del TRH en condiciones de balance energético positivo, contribuirá a definir los circuitos que regulan la actividad TRHérgica durante el establecimiento de la obesidad inducida por la dieta y pudieran a largo plazo facilitar el descubrimiento de nuevas terapias contra la obesidad.

4. HIPÓTESIS

El consumo de dieta rica en grasa genera concentraciones altas de lípidos en suero, por lo que proponemos que los triglicéridos y/o ácidos grasos son los responsables de regular la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina en el NPV durante el establecimiento de la obesidad inducida por dieta.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

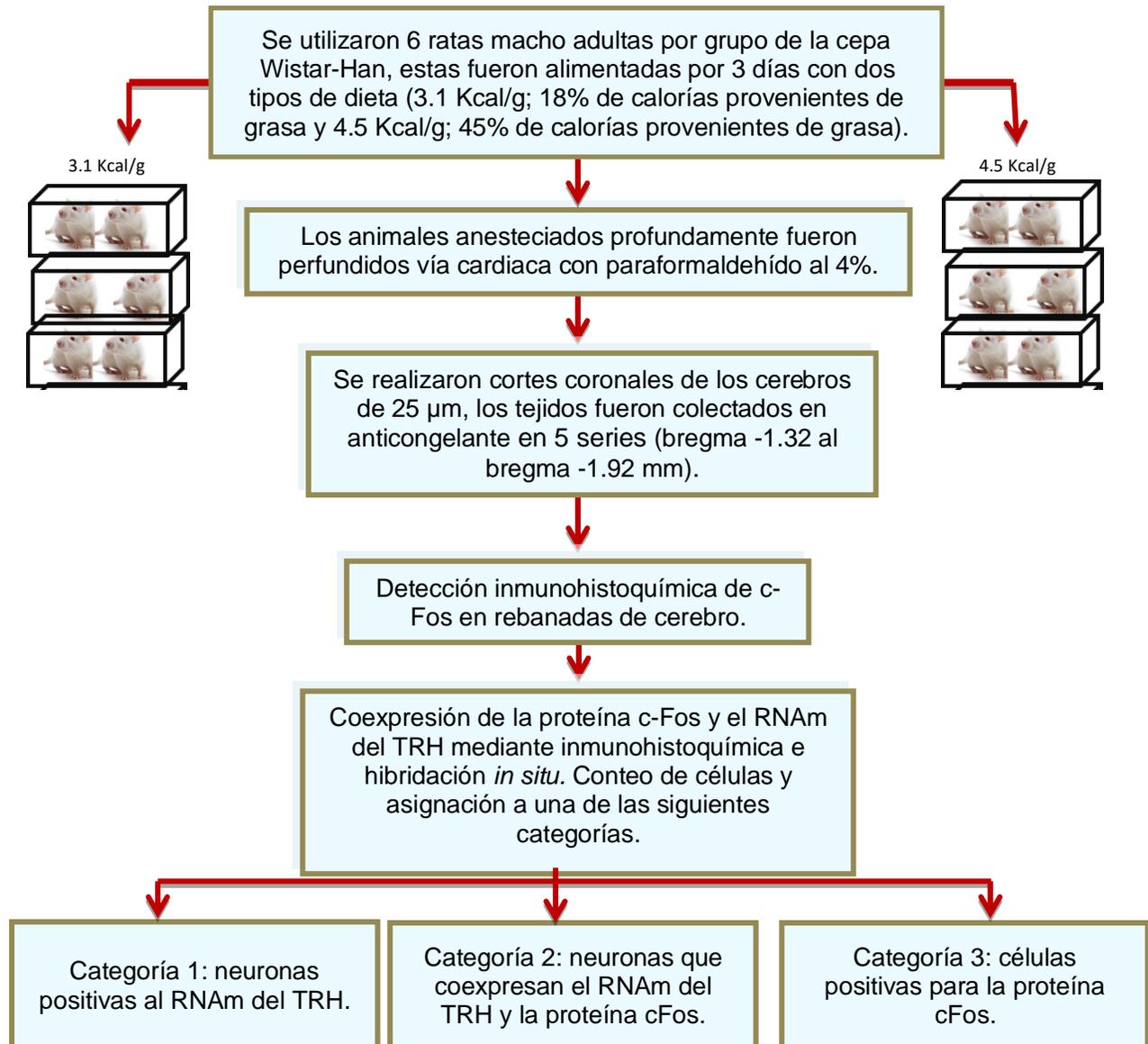
Definir si los triglicéridos y/o ácidos grasos libres regulan la actividad de las neuronas TRHérgicas en el núcleo paraventricular del hipotálamo en respuesta al consumo agudo de dieta alta en grasa.

5.2 Objetivos particulares

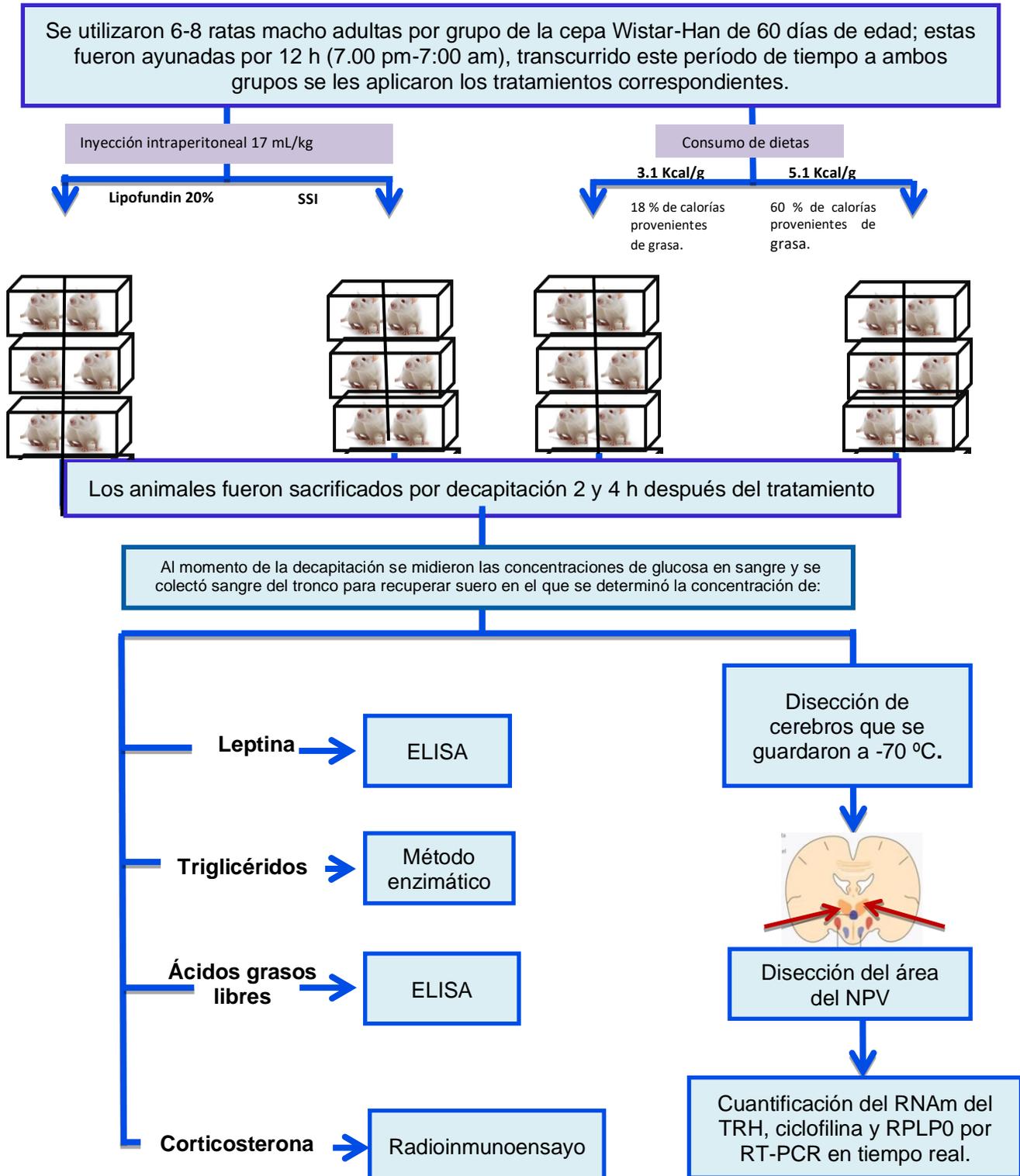
- 1) Determinar el % de neuronas TRHérgicas que expresan al factor transcripcional c-Fos en el NPV de ratas macho alimentadas con DAG por tres días.
- 2) Demostrar que el incremento de triglicéridos o ácidos grasos libres generados por la administración de dieta enteral o consumo de dieta alta en grasa modulan la biosíntesis del TRH en neuronas TRHérgicas del NPV en ratas macho.
- 3) Definir si la inducción aguda de altas concentraciones séricas de triglicéridos y/o ácidos grasos incrementa la expresión de c-Fos en las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo.

6. DIAGRAMAS EXPERIMENTALES

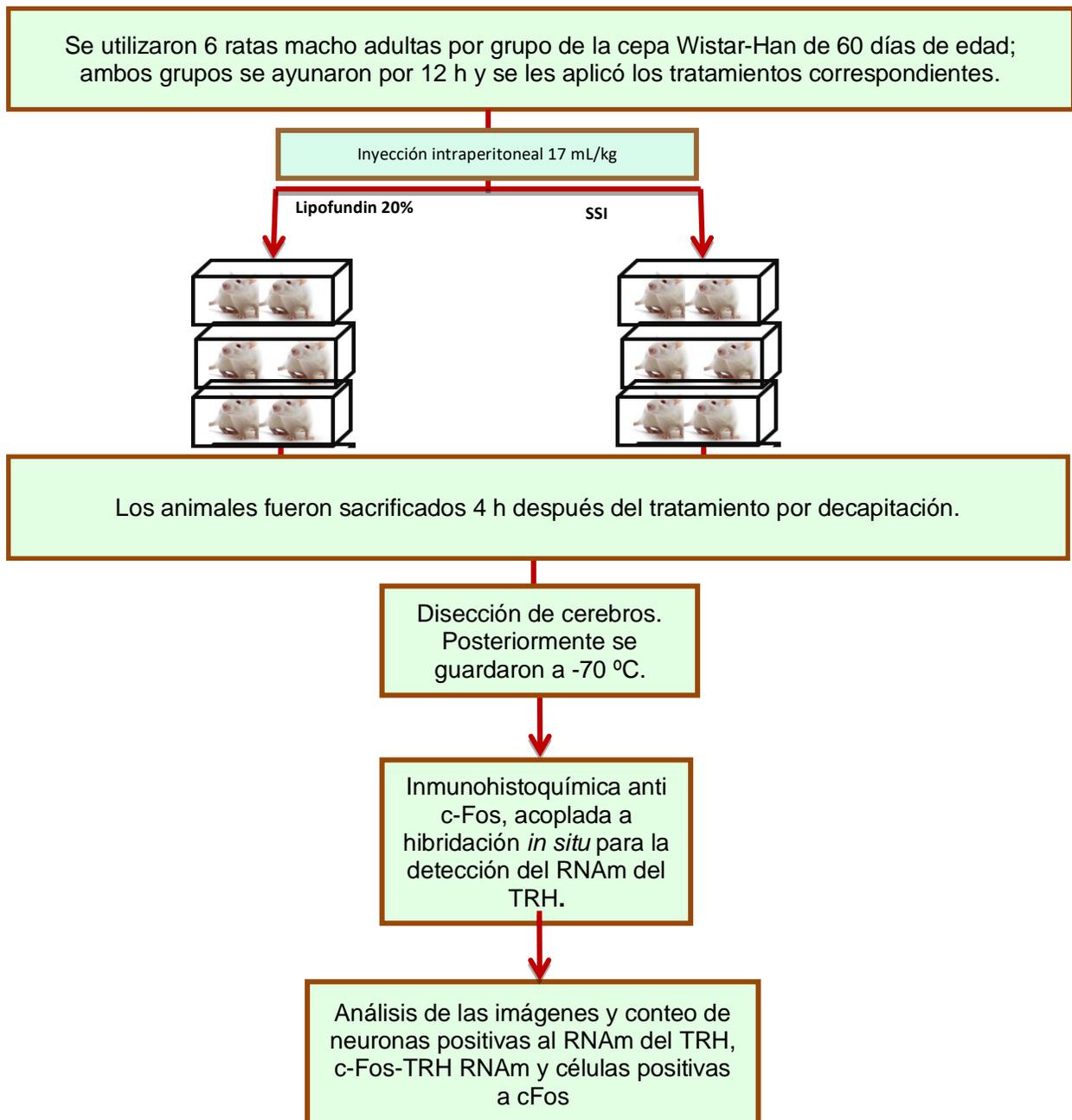
6.1 Diagrama experimental del objetivo 1



6.2 Diagrama experimental del objetivo 2



6.3 Diagrama experimental del objetivo 3



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

Todos los animales empleados en este estudio fueron ratas macho de la cepa Wistar-Han de 2 meses de edad, generadas en el bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM. Desde el momento del destete los animales fueron mantenidos con DR de 3.1 Kcal/g (2018SX; 18% de calorías proveniente de grasa) y agua *ad libitum*. Las salas del bioterio se mantienen siempre con un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (7:00 am – 7:00 pm) y temperatura controlada de 21-23 °C.

7.2 Protocolo del consumo agudo de DAG en roedores

7.2.1 Consumo de DAG y DR por 3 días

Empleamos 12 ratas, que fueron divididas en 2 grupos; antes de iniciar el experimento los animales fueron pesados y colocados en grupos de 2 animales por caja, teniendo especial cuidado de que los animales agrupados tuvieran un peso corporal similar. Esto permitió tener 6 animales por grupo y un triplicado en la medición del consumo de alimento. Los animales fueron alimentados durante 3 días con 2 dietas diferentes provenientes de Envigo (Teklad research diet):

1. DR de 3.1 Kcal/g, 2018SX (Aportación en Kcal: 24% proteína, 18% grasa y 58% carbohidratos).
2. DAG de 4.5 Kcal/g TD. 06415 (Aportación en Kcal: 19% proteína, 44.8% grasa y 36.2% de carbohidratos).

Al inicio del experimento y al tercer día se registró el peso corporal y el consumo de alimento. Al finalizar el experimento los animales fueron anestesiados y perfundidos vía cardiaca. Al inicio de la perfusión se disecó y pesó la grasa epididimal y se recolectó sangre del corazón para obtener suero que fue guardado a -20 °C.

7.3 Generación de incremento en la concentración de TG en suero en respuesta al consumo de DR o DAG por 4 h en animales ayunados por 14 h durante el período de actividad o alimentados *ad libitum*

En esta etapa empleamos animales alimentados *ad libitum* o con ayuno previo de 14 h, los cuales fueron alimentados con DAG (45% de calorías proveniente de grasa) o DR (18% de calorías proveniente de grasa), con el fin de establecer el mejor protocolo para generar un incremento en suero en las concentraciones de TG y ácidos grasos libres, generado por el consumo de la DAG, sin generar estrés o alterar la actividad de los animales en experimentación.

Procedimientos:

1) Un grupo de 8 animales (n= 4/grupo) se mantuvieron con alimentación *ad libitum* durante el período de actividad, 2 h después de que la luz se encendió en la sala los animales se pesaron y se colocaron en cajas en forma individual, proporcionando una cantidad fija de DR (18% de calorías provenientes de grasa) o DAG (45% de calorías provenientes de grasa) por 4 h. Transcurrido este período de tiempo, se colectó sangre de la vena de la cola (300-500 μ L) para determinar la concentración de TG. Determinamos el peso de las ratas y el consumo de alimento durante las 4 h. Estos animales se mantuvieron con DR 5 días más y posteriormente se utilizaron en el segundo procedimiento, esto con el fin de reducir el número de animales a emplearse en esta prueba piloto.

2) Los animales del procedimiento 1, previamente ayunados por 14 h durante el período de actividad, se sometieron al mismo procedimiento mencionado anteriormente. Con la excepción de que en estos animales se realizó el sacrificio por decapitación y se tomó una muestra de sangre del tronco (300-500 μ L) para medir la concentración de TG en suero, se disecaron los cerebros y posteriormente se guardaron a -70 °C.

7.4 Protocolo de la aplicación intraperitoneal de lipofundin o SSI y consumo de DR o DAG en animales ayunados por 12 h

1) Tratamiento con lipofundin 20% (Laboratorios Pisa, S.A. de C.V): Utilizamos un lote de 13 ratas las cuales fueron divididas en 2 grupos de 6 y 7 ratas, y un lote más de 16 ratas (n=8 ratas/grupo), estas fueron ayunadas por 12 h (7:00 pm - 7:00 am), una vez transcurrido este tiempo los animales fueron pesados e inyectados vía intraperitoneal (i.p) con 17 mL/kg de lipofundin 20% o con solución salina isotónica y colocados en cajas en forma individual. Después de 2 y 4 h de la inyección, los animales fueron pesados y sacrificados mediante decapitación, se determinó inmediatamente en la sangre del tronco la concentración de glucosa, empleando el glucómetro One Touch Select Plus y tiras reactivas. También colectamos sangre del tronco para obtener suero y determinar las concentraciones de leptina, insulina, TG, NEFA y corticosterona.

2) Un lote de 20 ratas las cuales fueron divididas en 3 grupos (n=7, n=6 y n=7 ratas/grupo) fueron ayunadas durante un período de 12 h, inmediatamente después se les permitió que consumieran DAG (5.16 Kcal/g; TestDiet 58Y1, proteína 18.1%, carbohidratos 20.3 %, grasa 60%) o la DR mencionada anteriormente. Los animales fueron pesados antes y después del consumo de alimento, se determinó el consumo de alimento/por rata y fueron sacrificados por decapitación 2 o 4 h después de iniciado el consumo de alimento. Se guardó sangre del tronco para obtener suero y realizar las determinaciones bioquímicas mencionadas en el punto 1.

Los cerebros fueron removidos del cráneo y congelados inmediatamente en hielo seco para guardarse a -70 °C. Posteriormente, se realizó la disección del NPV, purificación de RNA total y cuantificación del RNAm del TRH y controles internos (RNAs mensajeros de ciclofilina A (CyA) y la subunidad del tallo lateral de la proteína ribosomal P0 (RPLP0), por RT- PCR en tiempo real.

7.5 Protocolo de perfusión vía cardiaca

Las condiciones de trabajo para manipular muestras de RNA se muestran en el Anexo 1. La perfusión se realizó en animales con anestesia profunda, por lo que fueron inyectados vía i.p con una dosis letal de pentobarbital sódico (120 mg/kg) (Pet's Pharma de México, S. A. de C. V). Los animales quedaron inmovilizados dentro de pocos minutos y antes de

iniciar el procedimiento de perfusión se monitoreo la pérdida de sensibilidad en las patas y el color de los ojos, para minimizar el dolor durante el procedimiento. Para realizar la perfusión, se colocó la rata sin sensibilidad alguna, sobre una base, con ayuda de unas pinzas se levantó la piel a nivel del ombligo y con unas tijeras se cortó la cavidad abdominal abriendo lateralmente hacia la cabeza, se cortó a los lados de la caja torácica pasando por el diafragma y el esternón, se tomó el corazón con unas pinzas y se realizó un pequeño orificio en el ventrículo izquierdo para introducir un catéter en la vena cava; este se aseguró con unas pinzas hemostáticas, en seguida se realizó un orificio en la aurícula derecha, justo en este momento se colectó sangre del corazón para medir la concentración de triglicéridos en suero. El catéter esta acoplado a una bomba peristáltica que perfundió el tejido a una velocidad de 10 mL/1 min. La solución salina isotónica (SSI) con heparina (cloruro de sodio 0.95%-heparina 10 U/mL) se aplicó por 6 min, durante este tiempo se lavó la sangre de los tejidos, un buen indicador de que la perfusión se está realizando bien, consiste en que el hígado pierde su color rojo intenso. Inmediatamente después se cambió la SSI por paraformaldehído al 4% disuelto en PBS 1X (cloruro de sodio 0.136 M, fosfato de potasio 1.47 mM, fosfato de sodio 8 mM y cloruro de potasio 2.68 mM), se continuó con la perfusión durante 25 min. En este tiempo se disecó y pesó la grasa epididimal. Todo el proceso se realizó en una campana de extracción, al finalizar se disecaron los cerebros y se mantuvieron por 2 h con 4% de paraformaldehído. Transcurrido este tiempo, los cerebros se crioprotegieron con solución 20% de sacarosa disuelta en paraformaldehído 4% y se dejaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, se guardaron a -70 °C hasta su procesamiento. Nota: Se sugiere no mantenerlos congelados a -70 °C por mucho tiempo, es mejor rebanarlos y mantenerlos en anticongelante a -20 °C, para no incrementar el ruido de fondo en la inmunohistoquímica.

7.6 Obtención de series de cortes de los cerebros de las ratas

A) Los cerebros perfundidos y mantenidos a -70 °C, antes de seccionarse fueron aclimatados a la temperatura del criostato (-17 °C) por 1 h, posteriormente los cerebros fueron rebanados empleando un criostato (MODEL OTF, Bright Instrument Company LTD) a una temperatura de -17 a -20 °C, para esto los cerebros se montaron en una platina utilizando tissue-Tek (# Cat: 4583). Se realizaron cortes coronales de 25 µm a lo largo del hipotálamo, tomando como referencia el atlas de Watson y Paxinos, 2013. Se colectaron los cortes correspondientes al bregma -1.32 al bregma -1.92 mm, rango que

comprende al área del NPV. Los cortes se colectaron en 5 series, en cajas de cultivo de 24 pozos con 1 mL de anticongelante estéril y libre de RNAsas (50 mM de fosfato sódico pH 7, 30% etilenglicol y 20% de glicerol), éstos fueron guardados a -20 °C, hasta su utilización en la inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (Uribe *et al.*, 1999).

B) Los cerebros que no fueron perfundidos, se congelaron en hielo seco inmediatamente después de la disección y se mantuvieron congelados a -70 °C hasta su uso. Al momento de realizar los cortes de los cerebros, éstos se aclimataron a la temperatura del criostato (-17 a -20 °C) durante 1 h, posteriormente se montaron en la platina empleando tissue-TEK, y se recolectaron cortes coronales de 25 µm directo sobre los portaobjetos cargados (Fisherbrand. # 12-550-15), teniendo especial cuidado de que los tejidos quedaran bien adheridos. La recolección se realizó en series como se describió en el párrafo anterior. Posteriormente, las laminillas se guardaron en cajas y se mantuvieron a -70 °C, hasta su utilización en la inmunohistoquímica y/o hibridación *in situ*.

7.7 Detección de c-Fos por inmunohistoquímica en flotación en cortes de tejido de cerebro perfundido

Dos series de rebanadas se colocaron en una rejilla tipo canastilla, estos se sometieron a 3 lavados con PBS 1X. El primer lavado se realizó durante 10 min y los 2 posteriores durante 5 min para eliminar el anticongelante de los cortes, posteriormente se incubaron con peróxido de hidrógeno al 0.5% en PBS durante 10 min. Consecutivamente, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min, se permeabilizaron los cortes con tritón al 0.3% en PBS durante 30 min, se realizó el bloqueo con albúmina sérica bovina grado RIA (BSA) al 2%, 0.25% de heparina y 0.2% de tritón en PBS durante 1 h, con el fin de bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos con otros componentes del tejido. Después, se incubaron los cortes con 500 µL de 0.1% de tritón, BSA al 1% en PBS y con el anticuerpo primario realizado en conejo anti c-Fos (sc-52; Santa Cruz Biotechnology), dil: 1:500, a 4 °C durante un período de 36 h en una cámara húmeda. Para el revelado de la señal, los cortes se dejaron aclimatando a temperatura ambiente (TA) durante 30 min y en seguida se realizó un lavado con tritón al 0.1% en PBS durante 10 min. Posteriormente, se lavó con PBS durante 10 min 2 veces y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado de conejo, realizado en cabra (Vector Labs), dil: 1:200 en PBS durante 60 min. A continuación, se realizaron 2 lavados con PBS durante 10 min, y

se incubó durante 45 min con el complejo avidina/biotina acoplada a peroxidasa, preparado 30 min antes de utilizarlo (reactivo de ABC dil 1:50, Vector Laboratories), antes de revelar con el sustrato, se realizaron tres lavados con PBS durante 10 min. La reacción de color se desarrolló con 0.5 mg/mL de diaminobenzidina (3, 3'-diaminobenzidina, sigma cat # D-5637) y 0.01% de peróxido de hidrógeno, la formación del precipitado café se generó en 5 min. Se paró la reacción con 3 lavados de PBS, por 5 min. Una vez revelada la señal de color café en el núcleo de las células, los tejidos se guardaron a 4 °C y los cortes se montaron en portaobjetos cargados (Fisherbrand. # 12-550-15). Los cortes montados en los portaobjetos se dejaron secar durante 3 h o más en un desecador con vacío. Posteriormente, las laminillas se guardaron a -70 °C hasta la realización de la detección de RNAm de TRH por hibridación *in situ*.

7.7.1 Detección de c-Fos por inmunohistoquímica en cortes de cerebro montados en portaobjetos

Al momento de realizar la inmunohistoquímica, los cortes se sacaron de -70 °C en hielo seco y se secaron con la secadora de aire a una temperatura tibia, teniendo especial cuidado de que los tejidos no se despegaran. Una vez secas las laminillas, se dibujó un perímetro alrededor de los tejidos con un lápiz hidrofóbico, se dejó secar a TA y posteriormente se realizó la fijación de los tejidos con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos y 2 lavados con PBS durante 5 min. Posteriormente, se incubaron con 0.5% de peróxido de hidrógeno en PBS por 5 min. El proceso de incubación de anticuerpo y el revelado fue similar al descrito en el punto 7.7. En la incubación con los anticuerpos primarios, secundarios y el reactivo de ABC, se emplearon 60 µL de cada uno de los reactivos y los cortes fueron cubiertos con Parafilm, la incubación se realizó en una cámara húmeda para evitar evaporación, durante 36 h a 4 °C. Finalmente, los tejidos se pasaron por alcohol 70% y se guardaron a -70 °C.

7.8 Protocolo de detección del RNAm del TRH por hibridación *in situ*

7.8.1 Preparación del tejido previamente perfundido

Las laminillas con los cortes procesados por inmunohistoquímica se sacaron del ultracongelador en hielo seco y se secaron con la secadora de aire a una temperatura tibia durante unos 10 min, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10

min, se lavaron con PBS durante 5 min y se incubaron en proteinasa K (1µg/mL; EDTA 0.5 M, Tris 1M pH 8.0) a 37 °C durante 30 min, posteriormente se lavaron con PBS por 3 min, se acetilaron los cortes al colocarlos por 10 min en 4X SSC (20X de SSC: cloruro de sodio 3 M, citrato de sodio 0.3 M pH 7.0), que contiene 0.1 M de trietanolamina y 0.25% de anhídrido acético, con pH final de 8. En seguida, se lavaron los cortes en SSC 2X por 5 min e inmediatamente se realizó un proceso de deshidratación de los cortes en concentraciones ascendentes de alcohol (70%, 80%, 95% y 100%) por 2 min, y un paso de deslipidación de los tejidos con cloroformo por 5 min. Posteriormente, se trataron con alcohol al 100% y al 95% durante 2 min y se dejaron secar a TA.

Cuando la hibridación *in situ* se realizó con tejidos que no fueron perfundidos, la incubación con proteinasa K fue solo por 5 min.

7.8.1.1 Preparación de la sonda de cRNA marcada con Digoxigenina-UTP por transcripción *in vitro*

La sonda de cRNA utilizada fue generada mediante transcripción *in vitro*, para esto se utilizó 1 µg de plásmido (pGEM2-cDNATRH) linearizado con EcoR1, se le agregó 2 µL de buffer de transcripción 10X, 1 µL de UTP 5 mM (Roche), 1.5 µL de dig-UTP 3.5 mM (Sigma), 2 µL de DTT 100 mM, 3 µL de la mezcla de nucleótidos 10 mM; CTG, GTP, ATP (Roche), 1 µL de inhibidor de RNAsas (Roche), 2 µL de T7 RNA-polimerasa (Biolabs, SP6 Roche), se ajustó a un volumen final de 20 µL. Se incubó la mezcla a 37 °C, durante 1 h, se adicionaron nuevamente 2 µL de RNA polimerasa y se incubó durante 1 h a 37 °C, se adicionó 1 µL de DNAsa libre de RNAsa, 0.5 µL de inhibidor de RNAsas, incubación a 37 °C durante 45 min, para detener la reacción se agregaron 80 µL de DTT 20 mM, 10 µL de cloruro de sodio 4M, 1 µL de tRNA (10 mg/mL) y 330 µL de etanol absoluto frio (Merck). Los tubos se colocaron a -70 °C durante 3 h. A continuación, se centrifugaron a 13 500 rpm, durante 30 min a 4 °C. Los tubos se decantaron y la pastilla se lavó con etanol 75% frio y se dejó secar a TA. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNAsas y calentó 5 min a 65 °C. En seguida se tomaron 3 µL de la sonda que se guardó a -70 °C. El resto de la sonda se hidrolizó, se ajustó el volumen a 50 µL, se les agregó 30 µL de 0.2 M Na₂CO₃, 20 µL 0.2 M de NaHCO₃, se mezcló y se incubó a 60 °C 10 min, inmediatamente después se agregaron 2.5 µL de acetato de sodio 4.5 M pH 6.0 y 5 µL de ácido acético al 10%, se mezcló por inversión y a continuación se

precipitó la mezcla agregando 7.5 μ L de acetato de sodio 4.5 M pH 6.0, 1 μ L de tRNA, 300 μ L de etanol absoluto frío, y se dejó incubando a -70 °C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 13 500 rpm durante 30 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 50 μ L de etanol al 75% para eliminar las sales. Se centrifugó a 13 500 rpm durante 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se dejó secar pastilla a TA. Después, se resuspendió la pastilla en 50 μ L de 0.02% dodecil sulfato sódico (SDS) preparado con agua libre de RNAsas.

Para determinar la incorporación de la digoxigenin-UTP en la sonda, se colocaron 3 μ L de la sonda digerida, 3 μ L de la sonda sin digerir, 1 μ L de un RNA control marcado con digoxigenina (Roche), diluido 1:3 en agua libre de RNAsas, sobre una membrana de Nytran N poro 0.45 μ m. Los cRNAs se fijaron a la membrana con luz UV (Stratalinker), posteriormente se humedeció la membrana con buffer A (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM de NaCl), se incubó con 3% de blocking reagent disuelto en PBS 1X durante 5 min, y anticuerpo anti digoxigenina-fosfatasa alcalina, dil 1:1000 por 10 min. Transcurrido este tiempo, la membrana se incubó en buffer B (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M de NaCl y 50 mM MgCl) durante 5 min. El revelado de la señal se realizó en ausencia de luz, con (10 mL de buffer B con 45 μ L de nitroblue tetrazolium chloride; (NTB), 35 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato. Finalmente, se paró la reacción con buffer A.

7.8.2 Preparación de la solución de hibridación

Se utilizó 1 μ L de sonda de cRNA marcada con dig-UTP/ laminilla (50 μ L de solución de hibridación) previamente desnaturalizado 10 min a 65 °C ; 1 mL de solución de hibridación contiene: 100 μ L de 20X de SSC, 500 μ L de formamida con 20% de dextrán sulfato, 100 μ L de buffer de fosfatos (1M de fosfato de sodio pH 7.4 + 10% de sarcosyl), 10 μ L de denhart's 100X (ficoll 1 g, polivinil pirrolidona 1 g, albúmina sérica bovina grado V 1g; para un volumen final de 50 mL) , 25 μ L de DNA de esperma de salmón sonicado (10 mg/mL), 25 μ L de tRNA (10 mg/mL), 100 μ L de DTT 1 M (preparado en fresco en acetato de sodio 0.01 M; 0.08 g de DTT/50 μ L), 25 μ L de Poly A (10 mg/mL). Los cortes se cubrieron con 50 μ L de la mezcla de hibridación y se les colocó Parafilm sobre los tejidos para evitar la evaporación de la solución, se eliminaron las burbujas y se incubaron a 52 °C durante 6-12 h, la incubación se realizó en una cámara húmeda con 50% de formamida. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar los lavados pos-hibridación.

7.8.3 Condiciones empleadas en la post-hibridación

Antes de iniciar con el procedimiento, es necesario precalentar todas las soluciones a la temperatura adecuada. Una vez realizado lo anterior, se sacaron las laminillas del horno y cada uno de los portaobjetos se sumergió en SSC 1X 52 °C para retirar el Parafilm, se colocaron en rejillas y se lavaron dos veces con 2X SSC + 50% formamida durante 10 min y 20 min a 52 °C. Inmediatamente, se realizaron 2 lavados de 2X de SSC durante 3 min c/u a TA. En seguida se realizó un tratamiento con 2X de SSC, 1 mM de EDTA pH 8, 50 µg/mL de RNAsa A (previamente hervida durante 15 min; sigma) durante 30 min a 37 °C, para eliminar la RNAsa se realizaron 2 lavados durante 3 min con 2X SSC c/u a TA. Finalmente, se realizó un último lavado con 2X SSC + 50% de formamida a 52 °C durante 15 min. Al finalizar los lavados, los cortes se bloquearon y permeabilizaron con 4% de "blocking reagent" (Roche) disuelto en 50 mM de fosfatos pH 7.0, 0.1 M NaCl, con agitación constante durante 1 h y 2% de BSA, 0.3% de tritón disuelto en solución A (100 mM Tris- HCl pH 7.6, 100 mM de NaCl) 30 min a TA. Posteriormente, se lavaron 2 veces por 10 min en solución A y se incubaron con anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (FA) (dilución 1:500), 1% de BSA, 1.5% tritón en solución A, colocando 80 µL en cada laminilla. Las laminillas se cubrieron con un Parafilm y se colocaron en una cámara húmeda durante 36 h a 4 °C.

Para el revelado de la señal, las laminillas se colocaron 30 min a TA, se realizaron 2 lavados con buffer A por 10 min, 2 lavados con buffer B (100 Mm Tris-HCl pH 9.5, 0.1 M de NaCl y 50 mM MgCl) durante 10 min y se incubaron las rebanadas de 2-4 h para el desarrollo del color en la solución de revelado fría (10 mL de buffer B con 45 µL de 4 nitroblue tetrazoliun chloride; (NTB), 35 µL de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato y 2.4 mg de levamisole (esta solución debe protegerse de la luz; el desarrollo de la señal se monitoreó en el microscopio). La señal es un precipitado perinuclear de color morado. Para detener la reacción se realizaron 2 lavados con Buffer A y posteriormente se enjuagó con agua y se dejaron secar los portaobjetos con los tejidos procesados a TA. Finalmente, se realizó el montaje de los tejidos con líquido de montaje acuoso (Citifluor, EMS), los bordes se sellaron con barniz transparente para uñas.

7.9 Análisis de las imágenes

El análisis de las imágenes para la determinación del número de neuronas TRHérgicas, neuronas que coexpresan a la proteína c-Fos y el RNAm de TRH, y células positivas a la proteína c-Fos en el NPV, se realizó con ayuda de un microscopio Axioscop (Zeiss) acoplado a una cámara y a una computadora que contiene el programa Mercator (ExploraNova, La Rochelle, Francia). Con este software empleando el objetivo de 5X, se delimitó una maqueta sobre el NPV izquierdo o derecho en campo claro, en seguida se dibujó una rejilla sobre la zona trazada, lo que permitió contar con mayor facilidad y precisión los diferentes tipos de células. Para realizar el conteo se cambió al objetivo de 40X para identificar las neuronas TRHérgicas; células con tinción perinuclear de color morado fuerte (Categoría 1), células positivas a c-Fos; núcleos teñidos de color café (Categoría 3), células que coexpresan al RNAm del TRH y la proteína c-Fos; núcleos teñidos de color café, rodeados de color morado en la región perinuclear (Categoría 2). La categorización se realizó en forma manual, al finalizar de contar cada región, el programa calcula el número de células positivas a cada categoría. El análisis se realizó en las tres regiones del NPV (anterior, medio y posterior) como se ha reportado en otros trabajos (Sotelo-Rivera *et al.*, 2014). Para determinar el número de células de las tres categorías, los valores obtenidos de las rebanadas que comprenden la región anterior, media o posterior se promediaron (2 o 3 rebanadas por región). Para calcular el número total de células positivas al mRNA del TRH o c-Fos, se sumaron los 3 valores resultantes del número de células promedio de la región anterior, media y posterior del NPV. Para determinar el porcentaje de coexpresión de la proteína cFos en las neuronas TRHérgicas del NPV, se calculó el número total de neuronas TRHérgicas por rebanada en base a la suma de células cuantificadas (Cat1+ Cat2), en el NPV izquierdo o derecho, este valor correspondió al 100%. O sea:

% de coexpresión de cFos en las neuronas TRHérgicas del NPV= # de células de la Cat 2* 100/# total de neuronas TRHérgicas/rebanada.

Posteriormente se calculó el promedio del % de expresión de c-Fos en las neuronas TRHérgicas de la región anterior, media, posterior o total del NPV.

7.10 Controles

Como control negativo de la inmunohistoquímica, algunos tejidos fueron procesados igual que los tejidos experimentales sin adicionar el anticuerpo primario. Para la hibridación *in situ*, empleamos como control negativo la sonda sentido marcada con dig-UTP; como control positivo verificamos que la señal revelada con la sonda antisentido solo fuera observada en las regiones previamente identificadas, como el hipotálamo lateral y anterior (Segerson *et al.*, 1987).

7.11 Disección del área del núcleo paraventricular del cerebro congelado de rata

La disección del NPV se realizó en cerebros congelados, para lo cual, el cerebro se colocó sobre una gota de 100 μ L de agua esterilizada colocada sobre una caja de Petri; esto permitió mantener el tejido pegado a la caja de Petri. Sin permitir que el cerebro se descongelara, con una navaja tipo Gillette se realizó una rebanada coronal de 1 mm de grosor, el primer corte se realizó justo donde se separan el quiasma óptico y el segundo corte se realizó al inicio de la EM, esto se realizó tomando como referencia el atlas de Watson y Paxinos, 2013. Las rebanadas se colocaron inmediatamente sobre una caja de Petri llena de hielo seco para evitar la descongelación del tejido. El área que contiene al NPV se localiza lateralmente al tercer ventrículo, entre los dos fórnix, y como límite superior se tiene el borde del tercer ventrículo. El NPV se disecó empleando un microsacabocados de 1 mm de diámetro. Los tejidos disecados fueron colocados en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL (todo el material se debe mantener en hielo seco), posteriormente estos se guardaron a -70 °C hasta realizar la purificación y cuantificación de RNA total.

7.12 Purificación del RNA total del núcleo paraventricular del hipotálamo empleando un kit de QIAGEN

Se purificó el RNA total del NPV, siguiendo las indicaciones del RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN), el desarrollo del protocolo se muestra en el Anexo 2.

7.13 Determinación de la concentración de RNA total obtenido del núcleo paraventricular

Para la cuantificación del RNA total, de cada muestra se empleó 1 μL . La concentración de RNA fue determinada mediante un NANODROP 2000C a una longitud de onda de 260 nm, con la relación de 1OD= 40 μg , también determinamos la absorbancia a 230 y 280 nm y únicamente utilizamos las muestras que presentaron una relación de absorbancia 260/230 y 260/280 superior a 1.6.

Una vez realizado lo anterior se hicieron alícuotas de 0.5 μg de RNA para realizar la transcripción reversa.

7.14 Reacción de transcripción reversa

Tabla 2. Mezcla de reacción para la transcripción reversa.

	Reactivos	Volumenes
1	RNA total (0.5 μg), desnaturalizado por 5 min a 65 °C Preparar mezcla de reacción para todas las muestras que se van a procesar y colocar a cada muestra de RNA 18 μL de la mezcla	Ajustar a 12 μL
2	Agua libre de RNAsa	6.4 μL
3	Buffer (first strand) 5X	6 μL
4	Ditiotreitol (DTT) 0.1 M	3 μL
5	Oligos random (50 ng/ μL)	1.5 μL
6	Mezcla de dNTPs 10 Mm	0.6 μL
7	Transcriptasa reversa (200 U/ μL ; M-MLV Invitrogen)	0.5 μL
	Mezclar suavemente todos los reactivos	
	Total de volumen de reacción	30 μL

Las muestras de RNA ajustadas a un volumen de 12 μL con agua libre de RNAsas se calentaron 5 min a 65 °C, se dejaron reposando en hielo durante 5 min y se les agregó 18 μL de la mezcla de reacción; se mezclaron suavemente todos los reactivos. Las reacciones se incubaron en baño María, durante 2 h a 37 °C, transcurrido este tiempo, las muestras se colocaron 15 minutos a 70 °C, para inactivar la enzima. Posteriormente, se hicieron alícuotas de 5 μL y se guardaron a -20 °C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

7.15 Reacción de PCR en tiempo real y cuantificación del RNAm

Esta técnica se estandarizó en el laboratorio empleando el equipo QIAGEN Rotor-Gene Q. La mezcla de la reacción empleada se muestra en la Tabla 3. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 4. Las condiciones de amplificación se muestran en la Figura 5. Como controles internos se seleccionó al RNAm de ciclofilina A y la subunidad del tallo lateral de la proteína ribosomal P0 (RPLP0), esto debido a que se ha observado en el laboratorio que la expresión de estos genes no se altera en respuesta al balance energético positivo, con respecto al grupo control en el NPV. Como control negativo colocamos mezcla de la reacción de cada par de oligos sustituyendo el templado por 2 µL de agua. Para la amplificación del RNAm de los genes de TRH, CYCA y RPLP0 se utilizó una dilución de las muestras de 1:7 y 1 µM de los oligonucleótidos. La activación de la enzima se realizó a 95 °C por 3 min.

Tabla 3. Mezcla de reacción para la qPCR.

Reactivos	Volumenes
cDNA	2 µL
Agua grado milliQ	1 µL
Oligo sentido (S)	1 µL
Oligo Antisentido (AS)	1 µL
Kapa Sybr Green Fast 2X (Sigma)	5 µL
Total de volumen de reacción	10 µL

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos empleados en los ensayos de la qPCR.

Gen	Fwd	Rvs
TRH	`5- AGA GGG AGA GGG TGT CTT AAT - 3'	`5- GCT AGT GAA GGG AAC AGG ATA G- 3'
CYCA	`5-GCT GGA CCA AAC ACA AAT GG - 3'	`5- CTC CTG AGC TAC AGA AGG AAT G- 3'
RPLP0	`5-CTT TGT CTG TGG AGA CTG ACT AC-3'	`5- GAA GAG ACC GAA TCC CAT GTC- 3'

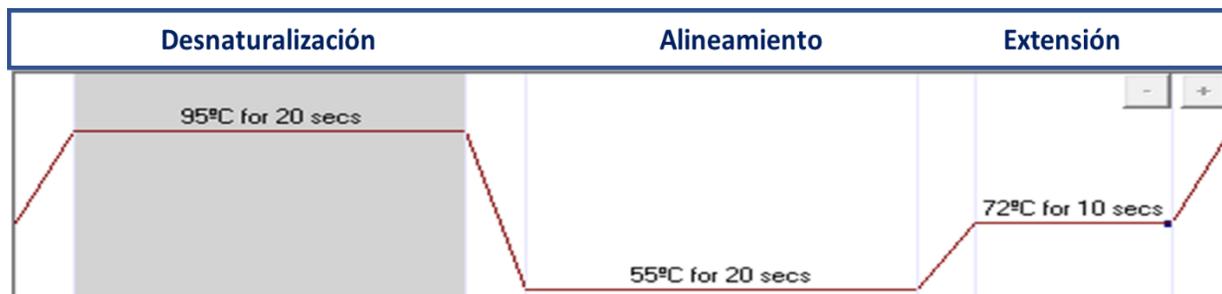


Figura 5. Condiciones de amplificación del RNAm de los genes de TRH, CycA y RPLP0. Para los 3 genes se utilizaron las mismas condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión (95 °C durante 20 s, 55 °C por 20 s y 72 °C durante 10 s).

El registro y análisis de los datos se realizó en el software Rotor-Gene Q Pure detection (QIAGEN). El análisis de los datos del nivel de expresión de los genes se realizó por el método comparativo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Datos no mostrados) (Livak and Schmittgen, 2001) y el método modificado de Pfaffl, 2001 (Vandesompele *et al.*, 2002). Por ambos métodos, se reprodujo el efecto de los tratamientos. Con la finalidad de presentar los resultados de una forma más simplificada, decidimos utilizar el método modificado de Pfaffl que incluye el promedio de los cálculos de los dos genes de referencia.

$$\text{Expresión del gen} = \frac{(E_{GOI})^{\Delta Ct_{GOI}}}{\text{GeoMean} [(E_{REF})^{\Delta Ct_{REF}}]}$$

Donde: **E** = Eficiencia

GOI= Gen de interés

REF= Gen de referencia

7.16 Determinación de la concentración de leptina en suero mediante el ensayo de ELISA

La cuantificación de leptina en suero de rata se realizó por medio de la técnica de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA; por sus siglas en inglés), para esto se siguió el protocolo de acuerdo con las instrucciones del kit (“Rat Leptin ELISA Kit” Crystal Chem, INC # cat. 90040).

Las placas de ELISA de 96 pozos se lavaron 2 veces, colocando 300 μ L de buffer de lavado en cada pozo, después de cada lavado se removió la solución por inversión y se secó la placa dando golpes leves sobre una toalla de papel. Posteriormente, se generó una curva estándar con las concentraciones 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 y 12.8 ng/mL. A cada pozo se le agregó 45 μ L de buffer diluyente (proporcionado por el Kit “marked “C”), 50 μ L de anticuerpo anti-leptina de rata desarrollado en cobayo (marked “D”), se agregaron por duplicado 5 μ L de los estándares de la curva y de las muestras por duplicado, se cubrió la placa con plástico y se incubó de 16-20 h a 4 °C. Posterior al período de incubación se decantó la solución y las placas se lavaron 5 veces con 300 μ L de buffer de lavado, se removió el anticuerpo y el material que no se unió específicamente golpeando suavemente la placa contra papel absorbente, se agregaron 100 μ L por pozo de anticuerpo anti-cobayo IgG acoplado a peroxidasa de rábano (POD) y se dejó incubando por 3 h a 4 °C. A continuación, se lavaron las placas 7 veces con 300 μ L de buffer de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo y se adicionó 100 μ L por pozo de la solución del sustrato (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina; TMB) de la enzima y se incubó en la oscuridad durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo con 100 μ L de la solución de stop (H_2SO_4 1N). Finalmente, las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC), a una absorbancia de 450 y 630 nm. La concentración de leptina se calculó por regresión lineal, generando la curva estándar con los estándares proporcionados por el kit, y los valores de absorbancia (A_{450} - A_{630}). <https://www.arigobio.com/elisa-analysis>

7.17 Determinación de la concentración de ácidos grasos libres mediante el ensayo de ELISA

La cuantificación de los ácidos grasos libres no esterificados se realizó en suero de rata por medio de la técnica de ELISA COMPETITIVO, para esto se siguió el protocolo de acuerdo con las instrucciones del kit “Rat Free Fatty Acid. # cat: MBS733451”.

En los pozos de la placa de ELISA se colocaron por duplicado el blanco (100 μ L de PBS pH 7.0-7.2) y 100 μ L de la curva estándar con las concentraciones 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5 y 10 μ g/mL, o bien 100 μ L de las muestras. A cada pozo se agregaron 50 μ L de conjugado FFA-HRP, excepto al blanco, se agitó la placa de ELISA por 1 min cubriéndola de la luz y posteriormente se incubó durante 1 h a 37 °C. A continuación, se realizaron 5 lavados con 300 μ L de buffer de lavado, se agregaron 50 μ L de sustrato “A” y 50 μ L de sustrato “B”, en cada pozo y se incubó 20 min a 37 °C, cubriendo la placa de la luz. El producto de la reacción enzima-sustrato formó un complejo color azul, finalmente se paró la reacción adicionando 50 μ L de solución de paro a cada pozo. Finalmente, se determinó la densidad óptica a 450 nm en el lector de placas. Para estimar la concentración de antígeno presente en la muestra se empleó la curva de calibración, generada mediante el método de logística de 4 parámetros y la absorbancia de las muestras a 450 nm.

7.18 Cuantificación de la concentración de insulina en suero mediante el ensayo de ELISA

La cuantificación de insulina en suero de rata se realizó por medio de la técnica de ELISA, para esto se siguió el protocolo de acuerdo con las instrucciones del kit ("Rat Insulin ELISA Kit" Crystal Chem, INC # cat. 90060).

En cada pozo se colocaron 95 μL de diluyente de la muestra y 5 μL de la curva estándar con las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4 ng/mL, o bien 5 μL de las muestras por duplicado y se incubó por 2 h a 4 °C. El sobrenadante se desechó de cada pozo y se hicieron 5 lavados con 300 μL de buffer de lavado, se colocaron 100 μL en cada pozo del conjugado enzimático anti-insulina y se incubó por 30 min a TA. A continuación, se realizaron 7 lavados, utilizando en cada lavado 300 μL de buffer de lavado, inmediatamente se agregaron 100 μL del sustrato de la enzima y se dejó incubando durante 40 min a TA, teniendo especial cuidado de no exponerlo a la luz. Posteriormente, se paró la reacción adicionando 100 μL de solución de paro y se midió la absorbancia a 450 nm y 630 nm en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan FC). La concentración de insulina se calculó por regresión lineal, usando la curva estándar y el valor que se obtiene de la resta de la absorbancia de 450 nm menos el obtenido a 630 nm.

7.19 Determinación de la concentración de corticosterona en suero por Radioinmunoensayo (RIA)

La determinación de corticosterona (CORT) se realizó mediante la técnica de RIA. A continuación, se elaboró una dilución de los sueros 1:500 en amortiguador RIA (50 mM de fosfato pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.1% de gelatina grado RIA Biorad). Los tubos con las diluciones realizadas se colocaron a 90 °C durante 10 min y se enfriaron a TA. En tubos de ensayo se colocaron 500 µL de cada muestra por duplicado, se agregaron 100 µL de Ab anti-CORT (ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA) diluido 1:10000 y 100 µL de ³H-corticosterona (Perkin-Elmer). Se preparó una curva estándar con los siguientes puntos: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg/500 µL de amortiguador RIA por triplicado. Se marcaron 3 tubos de ensayo como cuentas por minuto totales (cpmT) y añadieron 800 µL de buffer de RIA y 100 µL de ³H-corticosterona. A los tubos para determinar la unión inespecífica (NSB), se les agregó 600 µL de amortiguador y 100 µL de ³H-corticosterona. Mientras que, a los tubos en ausencia de hormona fría (B0), se les agregó 500 µL de amortiguador, 100 µL de ³H-corticosterona y 100 µL de Ab contra corticosterona. Los tubos se dejaron incubando a 4 °C durante 24 h. Posteriormente, se añadió 200 µL de carbón-dextrán (Sigma-Aldrich 4g/250 mL de amortiguador), se incubaron a 4 °C por 20 min y se centrifugaron a 3000 rpm a 4 °C por 15 min. El sobrenadante se transfirió a viales de centelleo y se adicionaron 4 mL de líquido de centelleo (Ecolite MP Biomedicals). Finalmente, se determinaron las cpm de cada vial en el contador de emisiones β (Beckman). La concentración de corticosterona de cada muestra se calculó con la ayuda de la curva, graficando el logaritmo de cada dosis de corticosterona vs el % de desplazamiento de la radioactividad en el sobrenadante que produce cada dosis de corticosterona (% B/B0). Lo que generó una curva de forma sigmoidea, donde se pudo hacer una aproximación a los límites de confianza inferior y superior del ensayo y una región de relación aproximadamente lineal entre las variables. Graficando el logaritmo de cada dosis de corticosterona en la curva contra una transformación matemática del % B/B0, obtuvimos una gráfica de dosis-respuesta lineal más adecuada para el cálculo de la concentración de corticosterona en las muestras. Para calcular los datos, usamos el programa de regresión Logit(B/Bo) vs log dosis de corticosterona donde:

$$\text{LogiT (B/Bo)} = \ln [(B/Bo)/(1-(B/Bo))]$$

7.20 Determinación de la concentración de triglicéridos en suero empleando un método enzimático

La determinación de los TG se realizó con el kit TG color GPO/PAP AA líquida de Wiener Lab. S.A.I.C. En una placa de 96 pozos se colocaron 2.5 μ L de suero por duplicado, 2.5 μ L de agua destilada por triplicado como blanco y 2.5 μ L de un estándar proporcionado por el kit. Una vez que se colocaron todas las muestras en la placa se adicionaron 250 μ L de reactivo A; buffer pH 6.8, clorofenol, lipoproteinlipasa (LPL), glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF) a cada una de las muestras. La placa se agitó e incubó 20 min a TA (18-25 °C). Posteriormente, se midió en un lector de placas a la absorbancia de 505 nm.

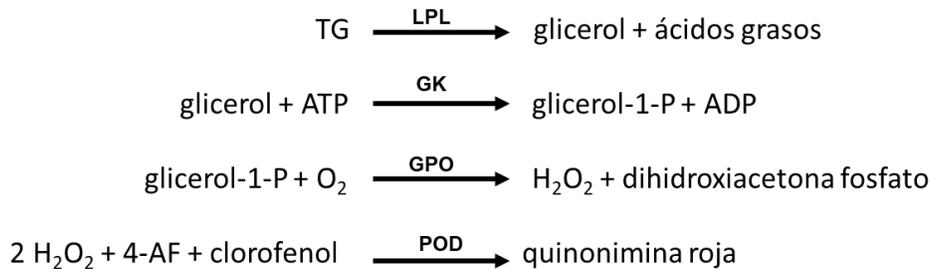


Figura 6. Esquema de reacciones enzimáticas empleadas en el kit para la determinación de la concentración de TG. Los TG en presencia de LPL liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado en presencia de GK para producir glicerol-1-P y adenosina-difosfato (ADP). El glicerol-1-P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en presencia de GPO. Finalmente, el H_2O_2 reacciona con 4-AF y p-clorofenol en presencia de POD dando una coloración roja. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de TG presentes en la muestra.

El cálculo de los resultados se realizó de la siguiente forma: a los valores de absorbancia de todas las muestras y control positivo se les restó el valor promedio del blanco y para el cálculo se emplearon estos valores. Se calculó un factor de corrección que consiste en la relación de (2g/L) / el valor promedio de la absorbancia del control positivo. La concentración de la muestra se calculó al multiplicar el promedio del valor de absorbancia de cada muestra por el factor. Los valores están reportados en g/L.

7.21 Análisis estadísticos

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Stat view. Se analizaron las diferencias entre grupos, mediante la prueba de t no pareada, o bien mediante el análisis de varianza. Cuando encontramos cambios significativos en el análisis de varianza, posteriormente se realizó el análisis de los datos por el método de comparación múltiple de Bonferroni. Los valores fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media (E.S.M), se consideraron diferencias significativas con una $p < 0.05$, y fueron indicados en las graficas: ** $p \leq 0.04$, *** $p \leq 0.02$ y **** $p \leq 0.01$. Las correlaciones fueron calculadas empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

8. RESULTADOS

8.1 Determinación de la coexpresión de la proteína c-Fos y el RNAm del TRH en el NPV de ratas alimentadas con DR o DAG por 3 días

8.1.1 Determinación de la ganancia del peso corporal

Al analizar la ganancia de peso, observamos que los animales que consumieron la DAG por 3 días ganaron significativamente más peso corporal que el grupo que consumió la DR (25.66 ± 0.95 vs 20.33 ± 1.4 , $p < 0.01$), (Figura 7).

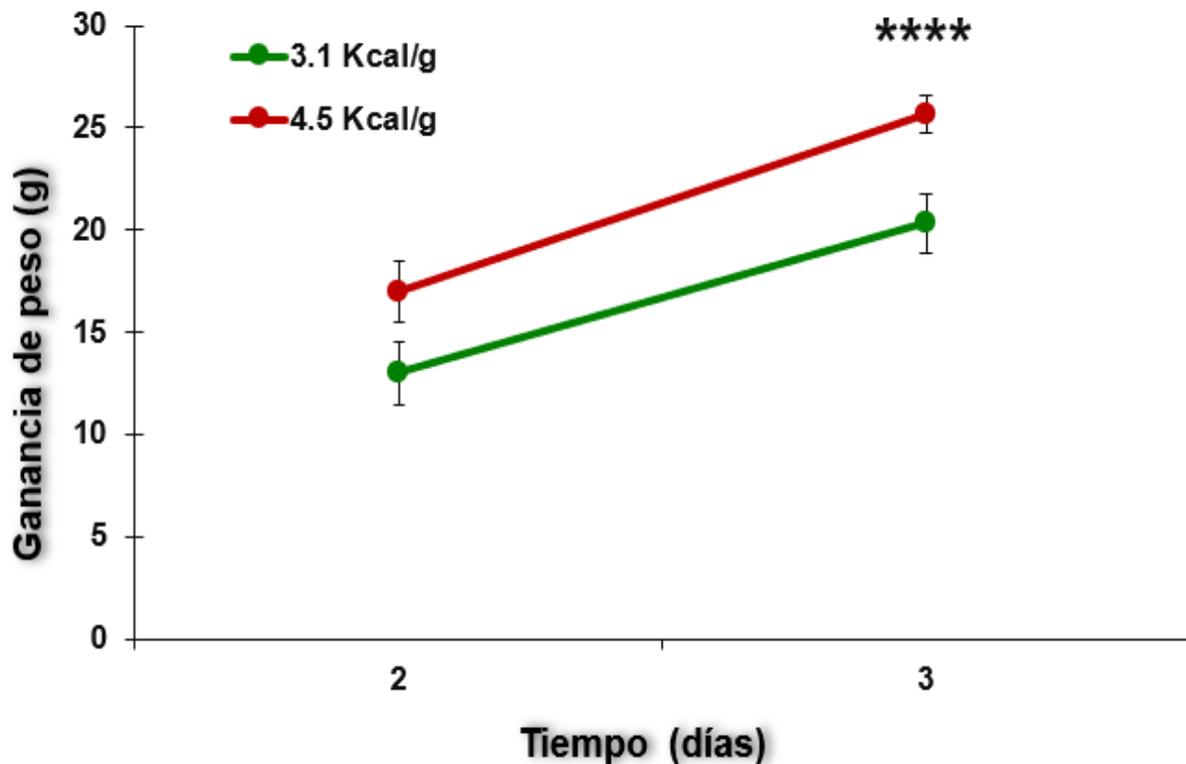


Figura 7. Influencia de la dieta sobre la ganancia del peso corporal de ratas que consumieron alimento con diferente cantidad de grasa (3.1 Kcal/g-18% y 4.5 Kcal/g-45%). Los puntos de la gráfica representan el promedio \pm ESM de la ganancia de peso. Significancia estadística: (*** $p < 0.01$). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. Se analizaron 6 animales por grupo.

8.1.2 Consumo de alimento y agua

En las ratas Wistar-Han, no se observaron cambios significativos entre los grupos sobre la cantidad de alimento y agua consumidos durante 3 días (Figura 8A y C). De acuerdo con lo previamente observado (Torres-Reyes, 2014; Ramírez-Bustos *et al.*, 2019), el consumo calórico durante 3 días fue significativamente mayor en el grupo que se alimentó con la DAG (**** $p < 0.01$), con respecto al grupo de ratas alimentado con la DR (Figura 8B).

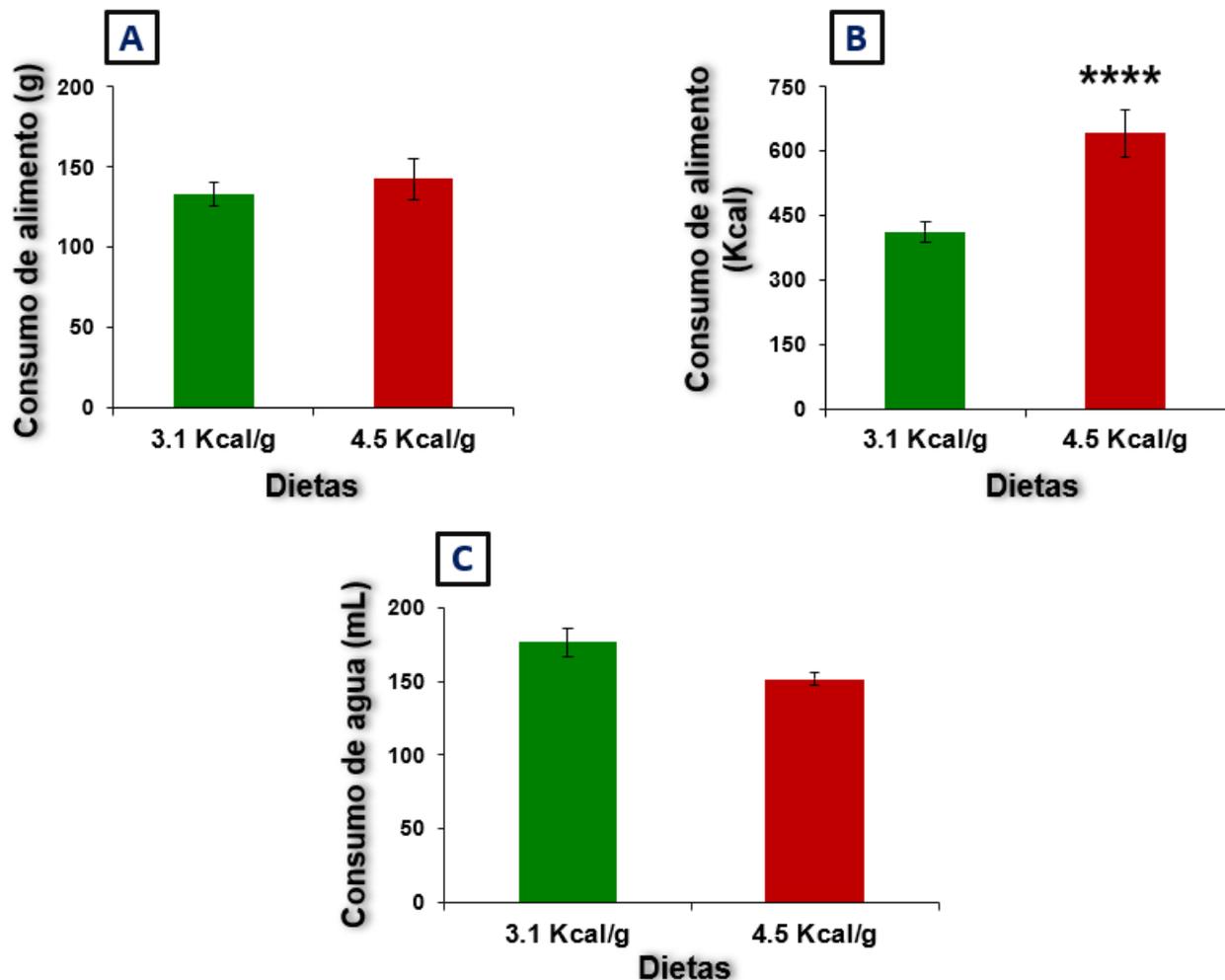


Figura 8. Efecto del consumo de las dietas con diferente aporte calórico y cantidad de grasa sobre la ingesta de alimento y agua. Los histogramas representan el promedio \pm ESM del consumo de alimento en gramos (panel A), kilocalorías (panel B) y agua (panel C) durante 3 días. Significancia estadística (**** $p < 0.01$). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. Se analizaron 6 animales por grupo (n para análisis estadístico= 3).

8.1.3 Determinación de la concentración de triglicéridos y la cantidad de grasa blanca epididimal

A los 3 días de tratamiento, no se encontraron cambios significativos en la concentración de triglicéridos en suero, ni en la cantidad de grasa epididimal (Figura 9A y B), entre el grupo que consumió DAG y el que consumió DR.

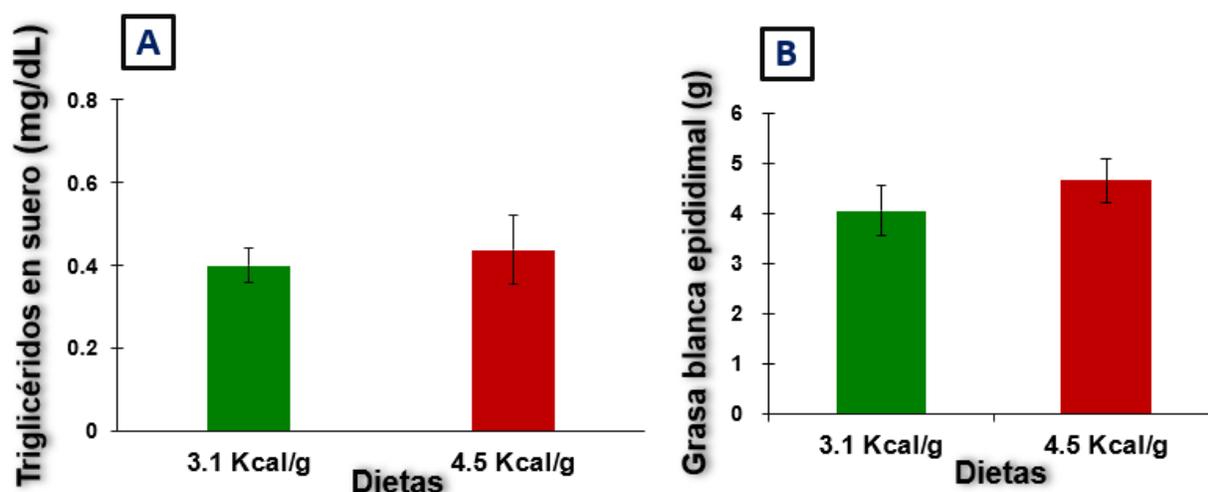


Figura 9. Efecto del consumo de las dietas sobre la concentración sérica de triglicéridos y la cantidad de grasa blanca epididimal. Los histogramas representan al promedio \pm ESM de la concentración de triglicéridos (Panel A) y la cantidad de grasa epididimal (Panel B) que acumularon las ratas de los dos grupos experimentales durante 3 días de consumo de las dietas con diferente aporte calórico y grasa. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. Se analizaron 6 animales por grupo.

8.2 Efectos del consumo de dietas con diferente aporte calórico sobre el número de neuronas TRHérgicas, la coexpresión del RNAm del TRH y la proteína c-Fos y el número de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo

Los conteos se realizaron en las tres áreas del núcleo paraventricular (anterior, medio y posterior) de ratas que consumieron durante 3 días, alimento con diferente cantidad de grasa (18% de calorías provenientes de grasa y 45% de calorías provenientes de grasa). Encontramos un mayor número de neuronas TRHérgicas por rebanada en la región anterior ($p < 0.01$) y parvocelular media ($p < 0.01$) en el grupo de ratas alimentadas con la DAG que en el grupo alimentado con DR (Figura 10A). En el análisis del NPV total (Figura 10B), observamos un incremento significativo de 80% en el número de las neuronas TRHérgicas en el grupo alimentado con la dieta hipercalórica, con respecto al grupo alimentado con DR (35 ± 4.3 vs 63.2 ± 5 células por rebanada, $p < 0.01$). La distribución representativa observada de neuronas TRHérgicas a lo largo del NPV se muestra en el Anexo 3.

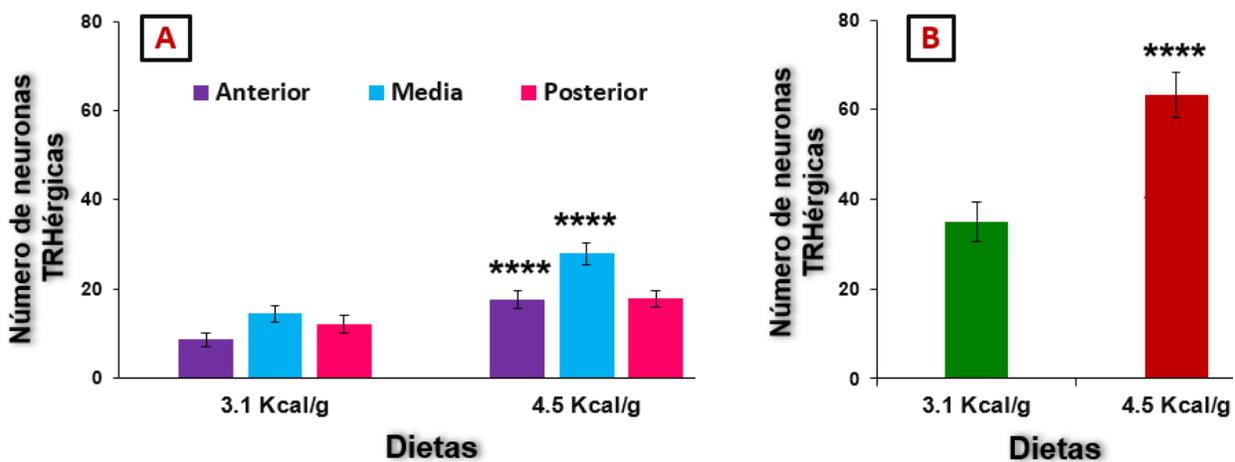


Figura 10. Análisis del número de neuronas positivas al RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar Han, alimentadas por tres días con dietas que contienen diferente aporte calórico y grasa. Los histogramas representan al promedio \pm ESM del número de neuronas TRHérgicas por rebanada en cada región, **** $p < 0.01$ (panel A) y el número de neuronas TRHérgicas del NPV total, **** $p < 0.01$ (panel B). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. Se analizaron 4 animales por grupo.

En el conteo de la coexpresión del RNAm del TRH y el c-Fos, observamos un porcentaje mayor de neuronas TRHérgicas que expresan c-Fos solo en la región posterior del NPV del grupo de ratas que se alimentó con la DAG (22.0 ± 2.4 vs 32.3 ± 1.5 , $p < 0.01$). No observamos cambios significativos en el porcentaje de coexpresión del RNAm del TRH y c-Fos en el análisis del NPV total (Figura 11B). En lo que respecta al análisis de las células positivas a c-Fos en el NPV por regiones, observamos un incremento de 93 % en la región anterior ($p < 0.02$), 92% en la región media ($p < 0.01$) y 66% en la región posterior ($p < 0.01$) del grupo de animales que consumió la DAG, con respecto al grupo que consumió la DR (Figura 11C). Este efecto se vio reflejado también en el número total de células positivas a c-Fos en el NPV, observándose 82% de incremento ($p < 0.01$), entre el grupo que consumió dieta hipercalórica con respecto al grupo que consumió la DR (Figura 11D). La distribución representativa de neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos por regiones y a lo largo del NPV se muestran en el Anexo 3.

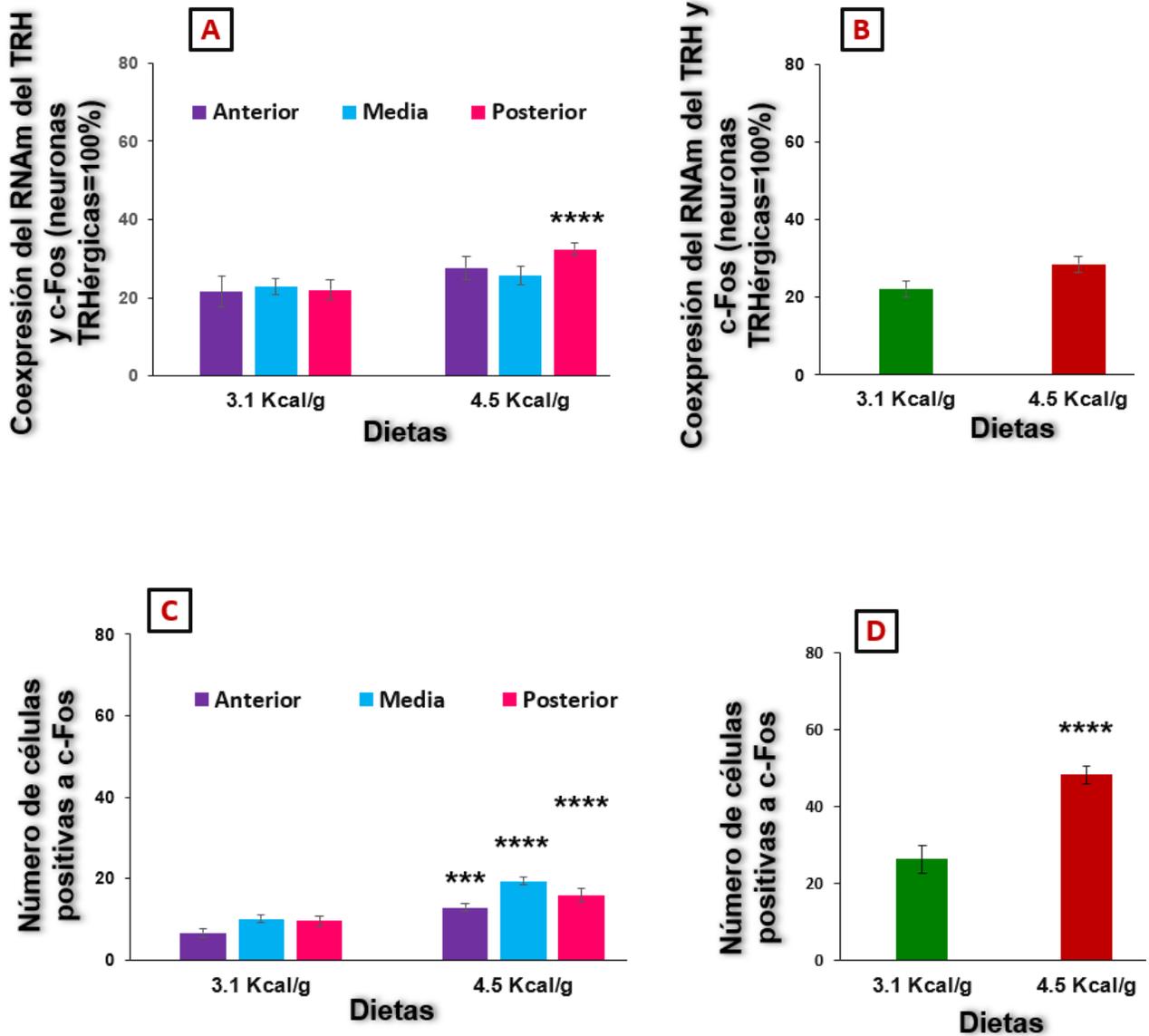


Figura 11. Cuantificación del porcentaje de neuronas TRHérgicas positivas a la proteína c-Fos y el número total de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar Han alimentadas con dietas que contienen diferente aporte calórico. Los histogramas representan al promedio \pm ESM del porcentaje de las neuronas TRHérgicas positivas al c-Fos en cada región del NPV (panel A), o del NPV total (panel B) y el número de células positivas a cFos por rebanada en cada región (panel C), o del NPV total (panel D). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. La significancia estadística se indica en cada una de las gráficas, * $p < 0.02$, **** $p < 0.01$. Se analizaron 5 o 4 animales por grupo.**

8.2.1 Análisis de la respuesta de las neuronas TRHérgicas a la DAG por 3 días en la cepa Wistar IGS

En estudios previos, empleamos la cepa Wistar IGS, en la cual demostramos que el consumo de DAG durante 3 días incrementa el nivel del RNAm del TRH en el NPV de ratas macho. Debido a que al inicio de este proyecto se cambió la colonia de ratas a la cepa Wistar Han, ya que esta cepa presenta en general un peso menor que la cepa Wistar IGS, decidimos determinar el % de la coexpresión del RNAm del TRH y de la proteína c-Fos en el NPV, en una serie de tejido de ratas Wistar IGS de animales alimentados por 3 días con las dos dietas. Esto con la finalidad de corroborar que obteníamos resultados similares en las 2 cepas Wistar. En el análisis por regiones, encontramos un mayor número de neuronas TRHérgicas en la región parvocelular media ($p < 0.02$) y posterior ($p < 0.04$) del grupo de ratas alimentadas con la DAG, con respecto al grupo alimentado con DR (Figura 12A). Si analizamos el número total de neuronas TRHérgicas en el NPV observamos un incremento de 62% entre el número de las neuronas TRHérgicas de ratas alimentadas con DAG (60.8 ± 5.5 vs 37.5 ± 3.5 , $p < 0.01$) con respecto al grupo alimentado con DR (Figura 12B). Los datos de la ganancia de peso, consumo de alimento y peso de la grasa epididimal de esta cepa se muestran en la Tabla 5. La distribución representativa de neuronas TRHérgicas a lo largo del NPV se muestra en el Anexo 4.

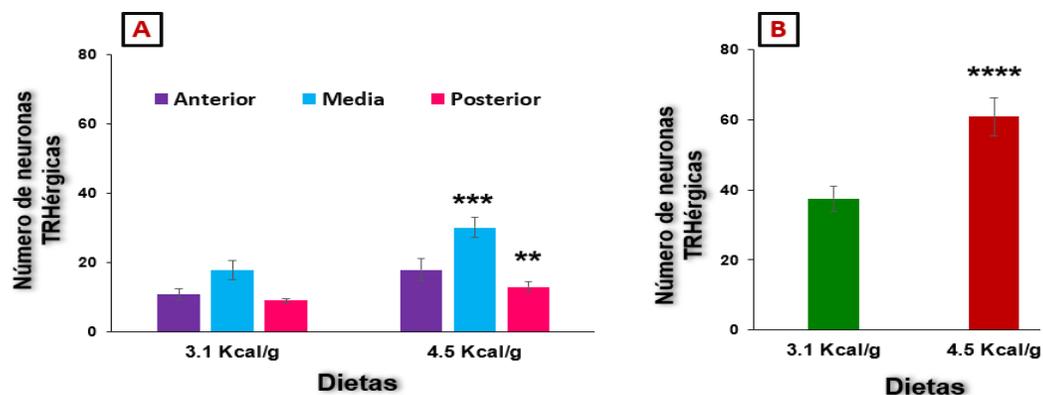


Figura 12. Análisis del número de neuronas TRHérgicas en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar IGS, alimentadas con dietas que contienen diferente aporte calórico durante 3 días. Los histogramas representan al promedio \pm ESM del número de neuronas TRHérgicas por rebanada en cada región. *** $p < 0.02$ y ** $p < 0.04$ (panel A) y el número de neuronas TRHérgicas del NPV total, **** $p < 0.01$ (panel B). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. Se analizaron 4 animales por grupo.

En el análisis de la cuantificación por regiones del NPV del hipotálamo de la coexpresión del RNAm del TRH y la proteína c-Fos, observamos un porcentaje mayor y significativo solo en la región anterior del PVN de ratas que se alimentaron con la DAG (Figura 13A). Mientras que, no observamos cambios significativos en la región media, posterior y el total del NPV entre los dos grupos (Figura 13B). Del análisis de las células positivas a c-Fos en el NPV por regiones, observamos un incremento significativo en la región anterior (6.6 ± 1.0 vs 15.1 ± 1.2 , $p < 0.01$), media (10.6 ± 0.8 vs 18.6 ± 1.0 , $p < 0.01$) y posterior (7.8 ± 1.1 vs 12.6 ± 0.6 , $p < 0.01$) del grupo de animales que consumió la DAG, con respecto al grupo que consumió la DR (Figura 13C). Este incremento significativo en el número de células positivas a la proteína c-Fos en las tres regiones del NPV, también se vio reflejado en un mayor número de células positivas a la proteína cFos en el NPV total ($p < 0.01$) (Figura 13D). La distribución representativa observada de neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a cFos por regiones y a lo largo del NPV se muestran en el Anexo 4.

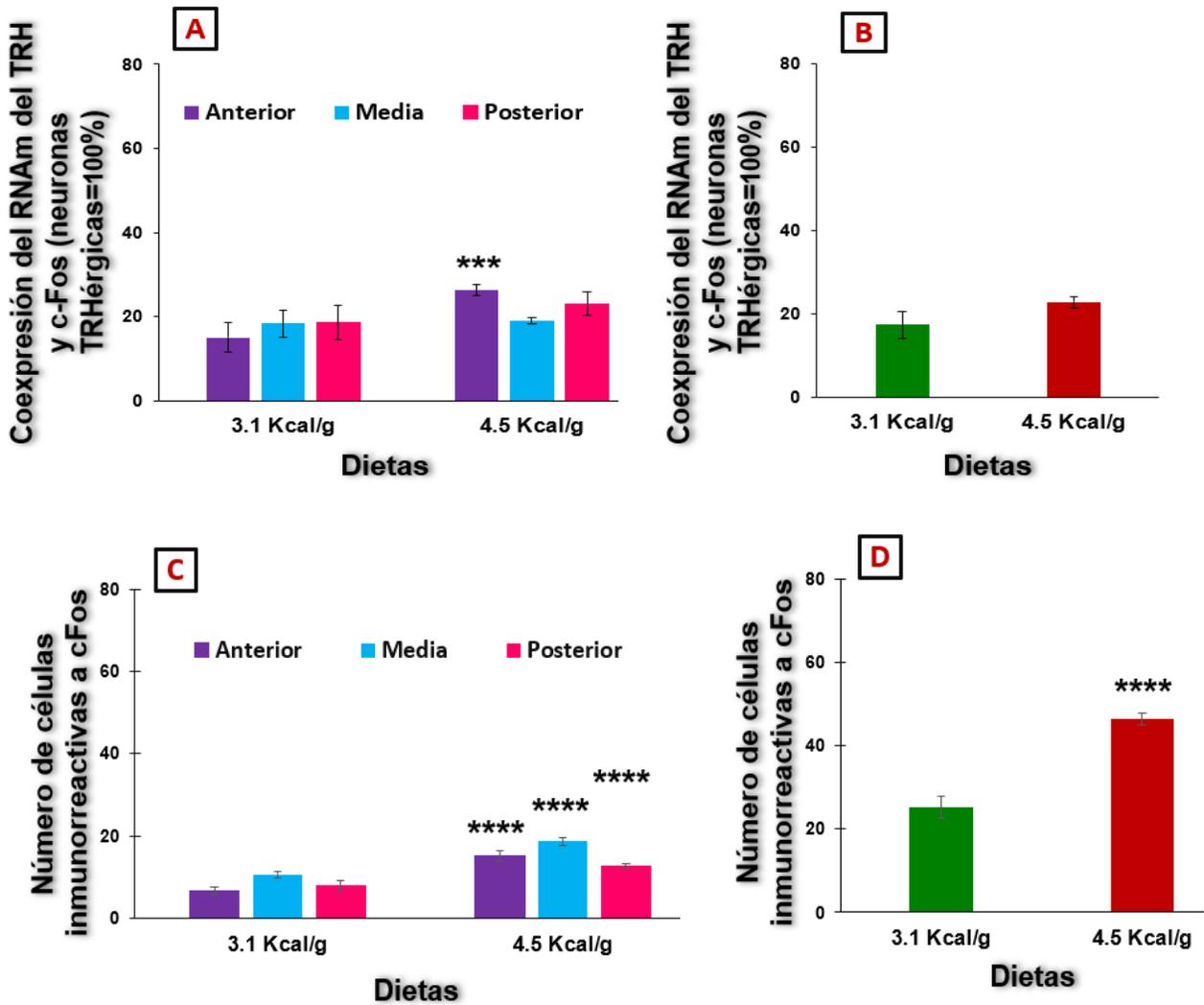


Figura 13. Cuantificación del porcentaje de neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y del número total de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo de ratas Wistar IGS, alimentadas con dietas que contienen diferente aporte calórico. Los histogramas representan al promedio \pm ESM del porcentaje de neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos en cada región del NPV (panel A), o del NPV total (panel B) y el número de células positivas a c-Fos por rebanada en cada región (panel C), o del NPV total (panel D). El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. La significancia estadística se indica en cada una de las gráficas, *** $p < 0.02$, **** $p < 0.01$. Se analizaron 4 animales por grupo.

En la tabla 5 y 6 se muestra una comparación de diferentes parámetros de interés entre la cepa Wistar-Han y la cepa Wistar IGS. En ambas cepas se observó un incremento significativo en el consumo de kilocalorías ($p < 0.01$) en el grupo de ratas alimentado con DAG, con respecto al alimentado con DR. Solo se mostró una ganancia significativa en el peso corporal del grupo de ratas alimentado con dieta hipercalórica de la cepa Wistar-Han ($p < 0.01$). Por otro lado, el comportamiento del número de células positivas a c-Fos fue similar entre la cepa Wistar-Han y Wistar IGS en la región anterior, media y posterior del NPV ($p < 0.02$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$), ($p < 0.01$, $p < 0.01$ y $p < 0.01$). En la coexpresión de c-Fos y el RNAm del TRH en el NPV se mostró un incremento significativo en la región posterior del NPV del grupo de ratas que consumió DAG, con respecto al grupo que consumió DR en la cepa Wistar-Han ($p < 0.01$), mientras que en la cepa Wistar IGS el incremento fue mayor en la región anterior ($p < 0.02$). En el número de neuronas positivas al RNAm del TRH se mostró un incremento significativo en la región media del NPV en la cepa Wistar-Han y Wistar IGS ($p < 0.01$, $p < 0.02$). Además, en la cepa Wistar-Han se observó un incremento significativo en la región anterior del NPV ($p < 0.01$). Entre tanto, en la cepa Wistar IGS se observó un incremento significativo en la región posterior ($p < 0.04$) en el grupo de ratas que consumió la DAG. En el análisis del NPV total en ambas cepas se mostró un incremento significativo en el número de neuronas TRHérgicas y el número de células positivas a c-Fos ($p < 0.01$) en el grupo alimentado con DAG, con respecto a grupo alimentado con DR.

Tabla 5. Comparación del efecto del consumo de las dietas con diferente aporte de grasa durante 3 días, sobre parámetros de interés entre la cepa Wistar-Han y la cepa Wistar IGS.

	Wistar Han Dieta 3.1 Kcal/g	Wistar Han Dieta 4.5 Kcal/g
Ganancia de peso (g)	20.33 ± 1.4	25.6 ± 0.9 ****
Consumo de alimento (Kcal)	412.3 ± 23.4	642 ± 56.1 ****
Grasa epididimal (g)	4.04 ± 0.5	4.6 ± 0.4
TG (mg/dL)	0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.08
	Wistar IGS Dieta 3.1 Kcal/g	Wistar IGS Dieta 4.5 Kcal/g
Ganancia de peso (g)	23 ± 1.2	26.5 ± 1.1
Consumo de alimento (Kcal)	500.6 ± 10	726.7 ± 2.2 ****
Grasa epididimal (g)	2.38 ± 0.34	3.2 ± 0.35
TG (mg/dL)	1.1 ± 0.29	1.2 ± 0.33

Tabla 6. Comparación del efecto del consumo de las dietas con diferente aporte de grasa durante 3 días, sobre el número de neuronas TRHérgicas, TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos, entre la cepa Wistar-Han y la cepa Wistar IGS.

	Wistar Han Dieta 3.1 Kcal/g			Wistar Han Dieta 4.5 Kcal/g		
	# de neuronas TRHérgicas	% de neuronas TRHérgicas positivas a cFos	# de células positivas a cFos	# de neuronas TRHérgicas	% de neuronas TRHérgicas positivas a cFos	# de células positivas a cFos
Región anterior	8.6 ± 1.4	21.6 ± 3.9	6.6 ± 1.2	17.5 ± 2.0****	27.6 ± 3.0	12.8 ± 1.0***
Región media	14.4 ± 1.9	22.8 ± 1.9	10.1 ± 1.4	27.9 ± 2.3****	25.5 ± 2.3	19.4 ± 0.8****
Región posterior	12 ± 1.9	22 ± 2.4	9.5 ± 1.3	17.8 ± 1.7	32.3 ± 1.5****	15.8 ± 1.6****
NPV total	35.0 ± 4.3	22.1 ± 2.1	26.3 ± 3.5	63.3 ± 5 ****	28.5 ± 2.0	48.1 ± 2.3 ****
	Wistar IGS Dieta 3.1 Kcal/g			Wistar IGS Dieta 4.5 Kcal/g		
Región anterior	10.7 ± 1.5	15 ± 3.3	6.6 ± 1	17.8 ± 3.0	26.3 ± 1.4***	15.1 ± 1.2****
Región media	17.8 ± 2.8	18.3 ± 3.2	10.6 ± 0.8	30 ± 2.8***	18.9 ± 0.7	18.6 ± 1.0 ****
Región posterior	9 ± 0.6	18.5 ± 4	7.8 ± 1.1	12.9 ± 1.4**	23 ± 2.7	12.6 ± 0.6****
NPV total	37.5 ± 3.5	17.3 ± 3.2	25.1 ± 2.7	60.8 ± 5.5****	22.7 ± 1.2	46.3 ± 1.4 ****

8.3 Efecto del incremento agudo de triglicéridos y ácidos grasos libres en suero sobre la biosíntesis del TRH en el NPV de ratas Wistar-Han

8.3.1 Efecto de la ingesta de DR y DAG (45%) durante un período de 4 h sobre la concentración de triglicéridos en ratas

8.3.1.1 Experimentos preliminares y optimización metodológica

Los animales alimentados *ad libitum* durante el período de actividad, mostraron un bajo consumo de alimento de DR o DAG, así como una pequeña pérdida de peso durante las 4 h siguientes del período de reposo, comportamiento observado regularmente en el bioterio. A pesar del bajo consumo, detectamos con este procedimiento un incremento en la concentración de triglicéridos en suero en el grupo de ratas alimentadas con DAG, pero no fue significativo. En cambio, los animales que se mantuvieron en ayuno durante el período de actividad, en cuanto se les proporcionó el alimento cualquiera que este fuera, consumieron una cantidad importante de las dietas durante el período de reposo. Esto se vio reflejado en un incremento en el peso corporal y el consumo de calorías. También se incrementó la concentración de triglicéridos en sangre, pero tampoco fue significativo (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del consumo de DAG (45% grasa) o DR (18% grasa) durante 4 h en ratas macho, previamente ayunadas durante 14 h o alimentadas *ad libitum*, sobre parámetros físicos y bioquímicos.

# de animales por grupo	Condición del animal previo al suministro de la dieta	Dietas	Ganancia de peso (g)	Consumo de alimento (Kcal)	TG (mg/dL)
n=4	Ad libitum	DR	- 5.25 ± 0.8	4.6 ± 1.5	1.01 ± 0.21
n=4	Ad libitum	DAG	- 4.2 ± 0.4	6.75 ± 2.9	1.54 ± 0.39
n=4	Ayuno 14 horas	DR	8.25 ± 1.93	15.8 ± 8.6	1.22 ± 0.30
n=4	Ayuno 14 horas	DAG	5.5 ± 0.86	25.3 ± 4.0	1.33 ± 0.21

Debido a que no observamos un incremento significativo en la concentración de triglicéridos en suero a las 4 h de consumo de DAG (45% de calorías provenientes de grasa), decidimos repetir el experimento en animales previamente ayunados durante 12 h con la finalidad de asegurar el consumo de alimento, y empleamos una dieta de 5.16 Kcal/g que contiene 60% de calorías provenientes de grasa, tal como lo reportan otros autores (Chang *et al.*, 2004).

8.3.1.2 Efecto de la ingesta de DR y DAG (60%) durante un período de 2 o 4 h, sobre el consumo de alimento, la ganancia de peso, la concentración de TG, NEFA, insulina, leptina, glucosa y corticosterona en suero de ratas Wistar-Han

En los grupos de ratas ayunadas por 12 h, observamos un incremento en el peso corporal dependiente de la cantidad de alimento consumido. Así como, mayor consumo de kilocalorías en el grupo alimentado con DAG que en el grupo que consumió DR a las 4 h de consumo. Los grupos que consumieron DAG durante 2 o 4 h tuvieron un incremento significativo en las concentraciones de triglicéridos en suero ($p < 0.01$), con respecto al grupo que consumió la DR por 4 h. Por otro lado, solo se observó un incremento significativo en suero a las 2 h posterior al consumo de la DAG en las concentraciones de ácidos grasos libres no esterificados, así como en las concentraciones de corticosterona ($p < 0.01$). Mientras que, las concentraciones de insulina en suero mostraron una disminución significativa ($p < 0.01$). No se observaron cambios significativos en las concentraciones de glucosa y leptina en suero (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del consumo de DAG (60%) o DR durante 2 o 4 h en ratas macho, previamente ayunadas durante 12 h, sobre parámetros físicos y bioquímicos.

# de animales por grupo	Dietas	Consumo de alimento (g)	Consumo de alimento (Kcal)	Ganancia de peso (g)	TG (mg/dL)	NEFA (μ g/mL)	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)	Leptina (ng/mL)	Corticosterona (ng/mL)
n=7	3.1 Kcal/g (4 h)	8.4 \pm 0.8	26.1 \pm 2	11.5 \pm 1.4	1.0 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	134.3 \pm 5.4	2.4 \pm 0.1	3.03 \pm 0.4	47.6 \pm 13.2
n=6	5.1 Kcal/g (2 h)	3.6 \pm 0.6	18.9 \pm 3.1	4.5 \pm 0.8****	2.5 \pm 0.4****	3.2 \pm 0.5****	145.1 \pm 5.6	1.16 \pm 0.1****	2.4 \pm 0.2	138.4 \pm 32****
n=7	5.1 Kcal/g (4 h)	6.8 \pm 0.4	35.3 \pm 2.3***	7.1 \pm 0.4****	2.3 \pm 0.4****	2.12 \pm 0.3	127.6 \pm 6.8	2.15 \pm 0.4	2.5 \pm 0.4	48 \pm 17.1

8.3.1.3 Efecto de la ingesta de DR y DAG (60%) durante un período de 2 o 4 h sobre el nivel del RNAm del TRH en el NPV

Durante la optimización de la cuantificación de los RNAs mensajero, se realizaron las curvas de amplificación de cada uno de los genes de interés del NPV del hipotálamo. En la Figura 14A se muestra la curva de amplificación del mRNA del TRH y de los mRNAs que fueron utilizados como controles internos (CycA y RPLP0; panel B y C), los valores de la eficiencia y R^2 . Observamos una relación inversamente proporcional entre la dilución de la muestra y el valor de Ct, con valores de la R^2 aceptables. Sin embargo, cabe notar que las eficiencias estaban fuera del rango óptimo (0.9-1.1), lo que pudiera haber afectado los resultados.

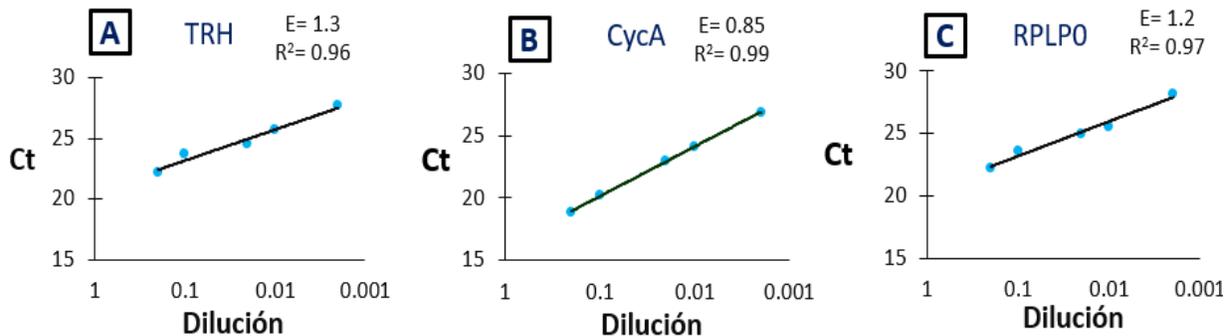


Figura 14. Curvas de amplificación en la qPCR para los RNAm de TRH, CycA y RPLP0 en el NPV. Se muestran las relaciones entre los valores de Ct y las diluciones de cDNA (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500), de los genes de TRH (panel A), CycA (panel B) y RPLP0 (panel C). Así como la eficiencia (E) y el coeficiente de correlación de Pearson al cuadrado (R^2).

Para asegurarnos del buen funcionamiento de la técnica de qPCR en nuestras manos, decidimos realizar la extracción del RNA total de microsacabocados obtenidos de 2 regiones del cerebro de la rata, en los que previamente se ha reportado que el nivel de expresión del RNAm del TRH es diferente (área preóptica y corteza cerebral). Se realizó la transcripción reversa como se mencionó en el punto 7.14, y posteriormente la qPCR. La expresión del RNAm del TRH se normalizó con el RNAm de RPLP0, empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se observó una mayor expresión del RNAm del TRH en el área preóptica, con respecto a la corteza (420.23 ± 3.6 vs 1.00 ± 0.07), resultados que están de acuerdo con lo esperado (Segerson *et al.*, 1887).

En el análisis de la expresión del RNAm del TRH en el NPV, no se observaron cambios significativos a las 2 h de ingesta de DAG (60%), con respecto al grupo que consumió la DR (18% de grasa). Mientras, que a las 4 h de consumo de DAG se observó un incremento significativo ($p < 0.01$) en los niveles de expresión del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo (Figura 15). Determinamos que en el grupo de 2 h que consumió la DAG, solo existe una correlación positiva entre el nivel del RNAm del TRH y la concentración de corticosterona ($r = 0.9$). En contraste, en el grupo de animales que consumió DAG por 4 h determinamos una correlación positiva entre el nivel del RNAm del TRH y las concentraciones de TG, NEFA, corticosterona y leptina ($r = 0.7$, $r = 0.8$, $r = 0.6$ y $r = 0.8$). Finalmente, en el grupo de animales que consumió la DR por 4 h, solo observamos correlación positiva entre el nivel del RNAm del TRH y las concentraciones de NEFA y leptina ($r = 0.6$, $r = 0.6$). Aunado a esto, se mostró una correlación negativa entre el nivel del RNAm del TRH y las kilocalorías consumidas en los grupos tratados con la DAG y DR en los diferentes tiempos de tratamiento (Anexo 5).

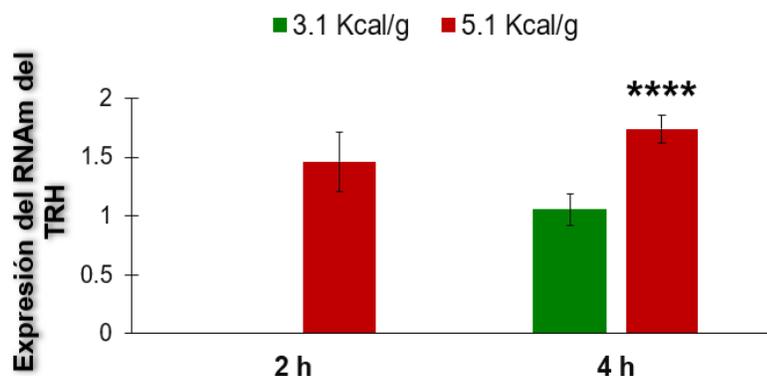


Figura 15. Niveles de expresión relativa del RNAm del TRH en el NPV de ratas alimentadas con DAG y DR. Los histogramas representan al promedio \pm ESM de los niveles de expresión del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo. Los niveles del RNAm del TRH se normalizaron con los niveles del RNAm de CycA y RPLP0 (**** $p < 0.01$) vs el grupo tratado con DR. Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza, para definir la diferencia significativa entre los grupos se empleó el método de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se analizaron 7 animales en el grupo tratado con DAG y DR a las 4 h de consumo de alimento y 5 animales en el grupo tratado con DAG a las 2 h de consumo.

8.4 Efecto de la aplicación intraperitoneal de lipofundin 20% sobre la ganancia de peso, la concentración de NEFA, TG, glucosa, insulina, leptina y corticosterona en suero de ratas

Con el fin de definir si los triglicéridos o ácidos grasos libres pueden modular la biosíntesis del TRH en el NPV del hipotálamo de la rata, se inyectó vía i.p una solución de ácidos grasos de cadena media y larga o SSI, en animales que fueron ayunados por 12 h como se mencionó en el punto 7.4. Los animales tratados con el lipofundin mostraron a las 4 h una disminución significativa en su ganancia de peso ($p < 0.05$), con respecto al grupo tratado con la SSI. De acuerdo con lo esperado, a las 2 o 4 h después de la aplicación de lipofundin se observó un incremento significativo en las concentraciones de TG en suero ($p < 0.01$), con respecto a los animales que fueron tratados con la SSI. Por otro lado, solo se observó un incremento significativo en suero en las concentraciones de NEFA a las 4 h posterior a la aplicación de lipofundin ($p < 0.01$). A las 2 h de la aplicación, observamos un incremento significativo en la concentración de glucosa en sangre ($p < 0.01$) en comparación con el grupo inyectado con SSI, el cual se normalizó a las 4 h. No se encontraron cambios significativos en las concentraciones de insulina, leptina y corticosterona en suero a las 2 y 4 h después de la aplicación de lipofundin (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la aplicación de lipofundin 20% a las 2 y 4 h en ratas macho previamente ayunadas durante 12 h, sobre parámetros físicos y bioquímicos.

# de animales por grupo	Tratamiento	Kcal administradas	Ganancia de peso (g)	TG (mg/dL)	NEFA (μ g/mL)	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)	Leptina (ng/mL)	Corticosterona (ng/mL)
	2 h								
n=7	SSI		1.4 \pm 1.3	0.6 \pm 0.09	2.3 \pm 0.40	69 \pm 1.3	0.42 \pm 0.05	0.95 \pm 0.20	89 \pm 30
n=6	Lipofundin 20%	8.89 \pm 0.12	1 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1****	2.7 \pm 0.37	96.5 \pm 5.5****	0.46 \pm 0.03	1.3 \pm 0.15	124.2 \pm 35.5
	4 h								
n=8	SSI		0.3 \pm 0.8	0.5 \pm 0.08	2.9 \pm 0.12	67.2 \pm 3.5	0.33 \pm 0.03	1.04 \pm 0.18	360.9 \pm 102.3
N=8	Lipofundin 20%	8.87 \pm 0.13	-1.3 \pm 0.1*	1.8 \pm 0.2****	5.3 \pm 0.69*****	71.1 \pm 2.0	0.40 \pm 0.04	1.5 \pm 0.17	443 \pm 175

8.4.1 Efecto de la aplicación intraperitoneal de lipofundin 20% sobre la expresión del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo

En el análisis de la expresión del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo, no observamos cambios significativos a las 2 y 4 h después de la aplicación intraperitoneal de lipofundin, con respecto al grupo tratado con SSI (Figura 16). Detectamos, que el nivel del RNAm del TRH correlacionó positivamente con la concentración de leptina en suero a las 2 h de la inyección de lipofundin ($r= 0.6$). En cambio, a las 4 h de tratamiento se observó una correlación positiva entre el RNAm del TRH y la concentración de corticosterona ($r=0.6$), (Anexo 5).

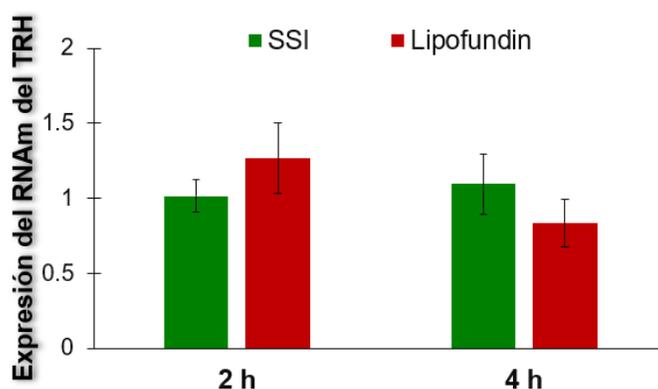


Figura 16. Niveles de expresión relativa del RNAm del TRH en el NPV de ratas tratadas con la inyección intraperitoneal de SSI o lipofundin 20%. Los histogramas representan al promedio \pm ESM de los niveles de expresión del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo en respuesta a la inyección i.p de lipofundin y Solución Salina Isotónica (SSI). Los datos se analizaron mediante el análisis de varianza. Se analizaron 7 animales en el grupo tratado con SSI y 6 animales tratados con lipofundin 20% a las 2 h de tratamiento, y 8 animales en ambos grupos a las 4 h de tratamiento.

8.5 Análisis del número de neuronas TRHérgicas, la coexpresión del RNAm del TRH y la proteína c-Fos y el número de células positivas a c-Fos en el NPV del hipotálamo, en respuesta a la inyección de lipofundin (4 h)

8.5.1 Efectos de la inyección de lipofundin o SSI sobre el peso corporal, la concentración de NEFA, TG, glucosa e insulina en suero

En los pesos de los animales que fueron inyectados con SSI y lipofundin después de 4 h, no se observó cambio significativo. En lo que respecta a la concentración de TG en suero y NEFA, se observó un incremento significativo ($p < 0.01$; $p < 0.03$) en el grupo de animales tratado con la inyección de lipofundin 20%, con respecto a los animales tratados con la inyección de SSI (Tabla 10). Efecto que habíamos observado en experimentos previos. A las 4 h de la aplicación de la emulsión de lípidos, no se mostraron cambios significativos en las concentraciones de glucosa e insulina en suero.

Tabla 10. Efecto de la aplicación de lipofundin 20% a las 4 h en ratas macho previamente ayunadas durante 12 h, sobre parámetros físicos y bioquímicos.

# de animales por grupo	Tratamiento	Ganancia de peso (g)	TG (mg/dL)	NEFA ($\mu\text{g/mL}$)	Glucosa (mg/dL)	Insulina (ng/mL)
	4 h					
n=6	SSI	0.5 \pm 0.56	1.14 \pm 0.18	1.03 \pm 0.12	71.2 \pm 3.9	0.42 \pm 0.11
n=6	Lipofundin 20%	1.8 \pm 0.5	2.95 \pm 0.22 ****	2.0 \pm 0.36**	77.6 \pm 2.5	0.71 \pm 0.12

8.5.2 Análisis de la expresión de c-Fos en las neuronas TRHérgicas del hipotálamo

En el análisis de las imágenes observamos un bajo número de células positivas a c-Fos en el NPV total, tanto en el grupo tratado con lipofundin (Figura 17B), como en el grupo tratado con SSI (Figura 17D), (12.9 ± 2.5 vs 10.4 ± 1.9). También observamos que el número de células positivas a c-Fos correlacionó positivamente con la concentración de NEFA en suero, en el grupo de animales tratado con lipofundin 20% ($r= 0.7$). Determinamos que el bajo número de células positivas a cFos en el NPV no se debió a errores en la técnica de inmunohistoquímica, ya que, al observar otros núcleos del hipotálamo, como lo son: el núcleo arcuato y el hipotálamo lateral, en ambos grupos se observó un gran número de células con señal positiva a la proteína cFos (Figura 17C y F).

Desafortunadamente, la hibridación *in situ* en las rebanadas sometidas a inmunohistoquímica no funcionó por lo que no fue posible detectar neuronas positivas al RNAm del TRH en las rebanadas de los cerebros de animales experimentales. Es probable que tuviéramos una contaminación durante el proceso de la inmunohistoquímica que provocó la degradación del RNA. Ya que, como control durante el proceso de la hibridación *in situ*, incluimos una serie de rebanadas de un tejido proveniente de un animal tratado con SSI, que no fue sometido a inmunohistoquímica, en las que si observamos señal positiva al RNAm del TRH. Mientras que no observamos señal en las hibridadas con sonda sentido (Datos no mostrados).

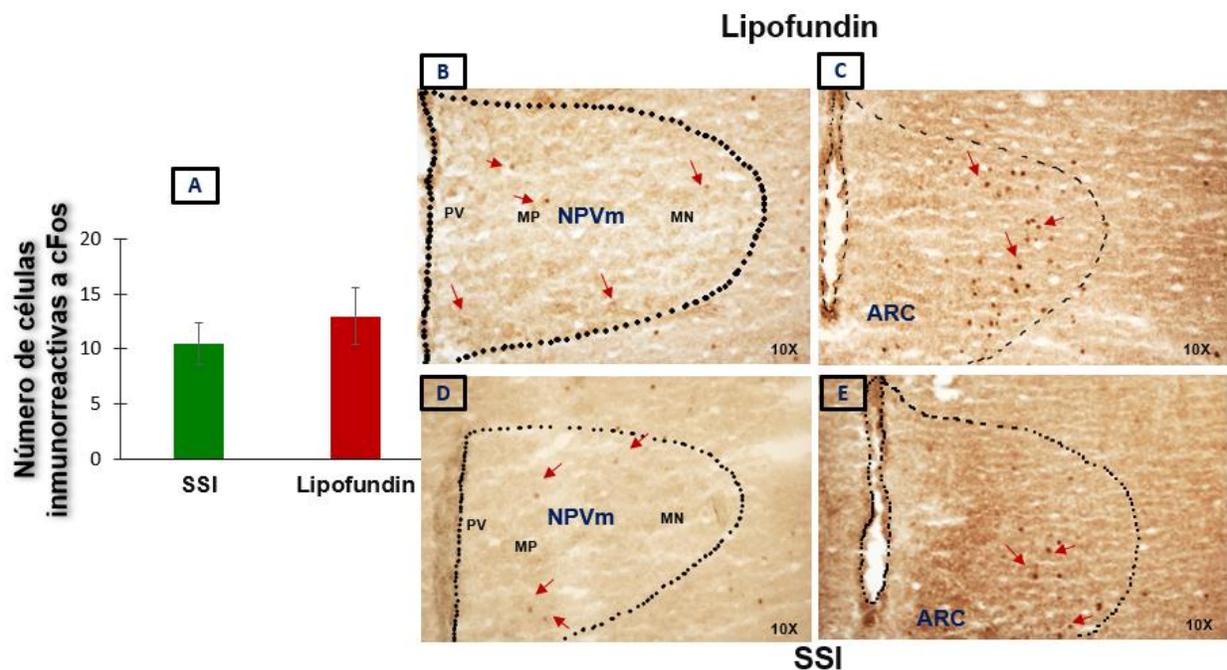


Figura 17. Detección de la proteína c-Fos en rebanadas de cerebro congelado, en respuesta a la aplicación de lipofundin o SSI a las 4 h. El histograma representa al promedio \pm ESM del número de células positivas a cFos en el NPV total (Panel A). Microfotografías representativas en campo claro de la señal positiva a c-Fos, en respuesta a la aplicación de lipofundin en el NPV_m (Panel B), núcleo ARC, (Panel C) y solución salina isotónica en el NPV_m (Panel D), núcleo ARC (Panel E). MP, Subdivisión parvocelular media del NPV; MN, Subdivisión magnocelular del NPV; PV, Subdivisión parvocelular periventricular. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba de T no pareada. Se analizaron 4 animales por grupo.

9. DISCUSIÓN

Los nutrientes provenientes de la dieta que alcanzan el torrente sanguíneo, como son los triglicéridos, los azúcares y los aminoácidos entre otros, tienen una participación importante en el control del consumo de alimento y en el mantenimiento de la homeostasis energética (Diéguez *et al.*, 2009). Conforman las primeras señales que activan los mecanismos de saciedad en la periferia y el SNC (Chambers *et al.*, 2014; Camilleri, 2015; Ueno and Nakazato, 2016). Sabemos que la biosíntesis del TRH en el NPV se regula por moléculas señal que se activan en respuesta al consumo de alimento regular o rico en grasa, como son la leptina, los glucocorticoides y las citocinas proinflamatorias, etc (Gou *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2010; Perello *et al.*, 2010; Sotelo-Rivera *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016). El consumo de DAG durante 30 días induce la biosíntesis del TRH en el NPV, y esta activación en parte está controlada por la señalización directa de la leptina (pSTAT3) sobre las neuronas TRHérgicas de este núcleo (Ramírez-Badillo 2011; Perello *et al.*, 2010; Ramírez-Bustos, 2018). En cambio, demostramos que el consumo de DAG por 3 días también activa la biosíntesis del TRH en el NPV, y a pesar de que la leptina está elevada en suero, no es la responsable de modular la biosíntesis del TRH en las neuronas del NPV en esta condición, evidenciado por el bajo número de neuronas TRHérgicas que coexpresan a las proteínas pSTAT3 y CREB fosforilada, un mediador de la señalización de la vía indirecta de la leptina (Ramírez *et al.*, 2019). Sin embargo, estas proteínas se incrementan en otros tipos celulares del NPV, siendo las neuronas que expresan CRH posibles candidatas (Hou *et al.*, 2004; Perello *et al.*, 2006). Esto demuestra que tanto la vía de señalización directa o como la indirecta de la leptina están activas en el NPV de animales que consumieron la DAG por 3 días en células diferentes a las TRHérgicas. Estos resultados nos sugirieron que otras vías o moléculas están involucradas en la regulación de la biosíntesis del TRH en esta condición.

Los TG y los NEFA, modulan la conducta alimentaria vía secreción de hormonas periféricas. El incremento de estas moléculas en suero, generado en respuesta al consumo de DAG o la aplicación periférica o i.p, inducen la expresión de c-Fos y diferentes neuropéptidos en distintos núcleos del hipotálamo como lo son el NPV, el ARC y el HL (Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007). A este respecto, se demostró *in vitro* que

el ácido palmítico puede modificar la expresión del α MSH en una línea celular de neuronas MSHérgicas (Tse *et al.*, 2017). A la fecha, no se sabe si los TG o los NEFA provenientes de la dieta modulan la biosíntesis del TRH en el NPV. Sin embargo, el hecho de que la leptina no éste involucrada en la activación de la biosíntesis del TRH en el NPV en respuesta al consumo de DAG durante 3 días y a que el incremento de los TG y los NEFA en suero inducen la expresión de diferentes neuropéptidos hipotalámicos, nos sugirió que estas moléculas podrían estar involucradas en la regulación de la biosíntesis del TRH en esta condición.

En este trabajo, analizamos si los TG o NEFA provenientes del consumo de DAG, o de la aplicación enteral de una solución de lípidos (10% de aceite de soya y 10% de triglicéridos de cadena media), inducen a corto plazo la expresión de la proteína c-Fos en las neuronas TRHérgicas del NPV. Debido a problemas de consanguinidad con la colonia de ratas del Instituto de Biotecnología, fue necesario reemplazar el pie de cría de la cepa Wistar IGS, por lo que se aprovechó para cambiar a la cepa Wistar Han, que en general presenta un peso menor que la cepa IGS (reportado por el proveedor). Verificamos que en la cepa Wistar Han, también se incrementa la biosíntesis del TRH en las neuronas TRHérgicas del NPV en respuesta al consumo por 3 días de DAG, como lo previamente reportado en la cepa Wistar IGS (Torres-Reyes, 2014; Ramírez *et al.*, 2019). Al igual que lo observado en la cepa Wistar IGS, el efecto fue mayor en la región media del NPV, donde se ha identificado a las neuronas TRHérgicas hipofisiotróficas (Merchenthaler y Liposits, 1994). Sin embargo, la activación no se mostró acompañada por incremento en la coexpresión de la proteína c-Fos, en las dos cepas analizadas. Lo que indicó que moléculas de señal que activan las vías de señalización que inducen la expresión de c-Fos no son responsables de modular la biosíntesis del TRH en esta condición. Sin embargo, es claro que el consumo de DAG por 3 días activa la expresión de la proteína c-Fos en otras células de este núcleo, siendo las neuronas que expresan CRH, encefalinas y galanina posibles candidatas (Chang *et al.*, 2004). A este momento, sabemos que la vía de señalización que regula la biosíntesis del TRH en el NPV en respuesta al consumo de DAG por 3 días, no es mediada por la leptina vía directa o indirecta, o por vías de señalización que activan a la proteína CREB fosforilada o c-Fos.

Hemos observado, que la concentración de hormonas tiroideas y corticosterona en suero no se alteran en esta condición de balance energético positivo, por lo que pensamos que no pueden estar involucradas en la respuesta. Se ha propuesto, que el consumo de DAG por períodos cortos de tiempo puede generar mecanismos de resistencia a insulina y leptina en otros órganos, pero no se ha demostrado que ocurra en el NPV (Lin *et al.*, 2001). Además, de ocurrir resistencia en las neuronas TRHérgicas del NPV, esta debería ser transitoria porque en ratas obesas se ha demostrado que en las neuronas TRHérgicas del NPV no se genera resistencia a la leptina como ocurre en otros núcleos del hipotálamo (Perello *et al.*, 2010).

Varios reportes han mostrado que el consumo de DAG por tiempo corto activa señales de inflamación en el cerebro, como es la inducción de la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), así como incremento en el número de astrocitos y microglía en el núcleo arcuato del hipotálamo (Thaler *et al.*, 2012; Dalvi *et al.*, 2017; Douglass *et al.*, 2017). Se ha propuesto, que el aumento de TNF α en respuesta al consumo de DAG por períodos cortos de tiempo, está relacionada con un efecto termogénico del TNF α en respuesta al balance energético positivo (Romanatto *et al.*, 2007). Además, se sabe que en roedores las neuronas del NPV expresan al receptor TNFR1 (Glass *et al.*, 2017). Por lo que no podemos descartar que esta molécula pudiera estar participado en la regulación de la biosíntesis del TRH en esta condición. Sin embargo, es controversial la activación de los astrocitos en respuesta al consumo agudo de DAG en el NPV, a diferencia de lo descrito en el ARC (Thaler *et al.*, 2012; Dalvi *et al.*, 2017). Esto puede indicar que, si bien el TNF α podría estar participando en la regulación de la biosíntesis del RNAm del TRH en este núcleo, podría también ser en forma indirecta. Debido a que este incremento en la biosíntesis del TRH en respuesta al balance energético positivo, generado por el consumo agudo de DAG, pudiera incrementar la termogénesis en el BAT como un efecto anti-obesógeno (Murakami *et al.*, 2001; Bianco and McAninch, 2013), nos resulta de suma importancia definir, cuáles serían las señales que activan la biosíntesis del TRH en esta condición, dado su potencial como terapia alternativa para contrarrestar la obesidad.

9.1 Efecto del incremento en la concentración de TG o NEFA en la sangre sobre la biosíntesis del TRH en el NPV.

Una vez que los triglicéridos contenidos en la grasa de la dieta ingresan al sistema gastrointestinal, se degradan por la lipoprotein lipasa y pasan al torrente sanguíneo como ácidos grasos libres, y éstos vuelven a generar nuevos triglicéridos. Existen varios reportes donde se muestra que el consumo de DAG eleva en el suero los TG o NEFA en forma transitoria, ya que el consumo de esta dieta genera la activación de la lipogénesis (Crescenzo *et al.*, 2017), o bien la utilización de estas moléculas por las mitocondrias para generar energía y la generación de cuerpos cetónicos (Houten *et al.*, 2016). En los animales que consumieron DAG o DR durante 3 días la concentración de TG o NEFA en plasma fue similar, posiblemente porque el sacrificio se realizó al menos 6-8 h después de que los animales consumieron la mayor cantidad de alimento. Como lo mencionamos anteriormente, los ácidos grasos y en particular los saturados de cadena larga regulan la actividad de neuronas peptidérgicas en el hipotálamo que sintetizan orexina, encefalina, melanocortina, galanina o NPY, y a su vez, los ácidos grasos activan la expresión de cFos en el NPV (Chang *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2007; Schwinkendorf *et al.*, 2011; Tse *et al.*, 2017). Con la finalidad de definir si las neuronas TRHérgicas del NPV son blanco de los TG o NEFA, generamos incremento en la concentración circulante de éstos, en respuesta al consumo de DAG o a la aplicación i.p de una solución de ácidos grasos a las 2 o 4 h de tratamiento en animales con ayuno previo durante el período de actividad, la condición de ayuno se utilizó para asegurarnos que los animales consumieran el alimento durante las 4 h en el período de reposo, ya que los roedores consumen la mayor cantidad de alimento durante el período de actividad, y monitoreamos la concentración de insulina, leptina, corticosterona y glucosa en suero. La dieta con 45% de grasa como aporte calórico, no fue suficiente para incrementar significativamente la concentración de TG en suero, con respecto a los animales que consumieron DR, al incrementar la cantidad de grasa (60%) en el alimento logramos un incremento significativo en la concentración de TG en el grupo de animales que consumió la DAG, con respecto al que consumió la DR. También detectamos elevación de la concentración de NEFA, la cual fue transitoria (pico 2 h). Esto puede deberse a que los animales vienen de un período de 12 h de ayuno, y en cuanto hay un incremento en los NEFA, rápidamente estos son transportados al interior de la mitocondria para entrar al proceso de β -oxidación y

satisfacer la demanda de energía (Houten *et al.*, 2016). De acuerdo con lo previamente reportado, no encontramos cambio en la concentración de leptina y glucosa en suero, en los 2 tiempos analizados. Sin embargo, la concentración de insulina y corticosterona se vio afectada en el grupo de 2 h de consumo de DAG. La disminución en la concentración de insulina en suero en este grupo puede deberse a que los animales vienen de un ayuno de 12 h y el nivel de glucosa puede ser bajo, además de que el aporte calórico de la grasa es mayor que el de los carbohidratos en la dieta que empleamos para el estudio. Como no incluimos un grupo alimentado con DR a las 2h, no podemos descartar que sea una respuesta al ayuno previo al cual fueron sometidos los animales (Rakvaag *et al.*, 2019). A diferencia de la insulina, en este grupo ocurrió incremento en la concentración de corticosterona en plasma, que puede deberse al ayuno de los animales. Sin embargo, previamente se ha reportado que el ayuno de 12 h en la rata macho no genera incremento en suero en el nivel de este glucocorticoide (Nowland *et al.*, 2011). Por otro lado, se sabe que el consumo de DAG por períodos cortos de tiempo en ratas macho induce aumento de la corticosterona en plasma (Cano *et al.*, 2008; Abildgaard *et al.*, 2014), por lo que el incremento en la concentración de corticosterona en el grupo de 2 h pudiera ser una respuesta al consumo de esta dieta.

Observamos que el RNAm del TRH se incrementó a las 4 h en respuesta al consumo de DAG, sugiriendo que los TG y NEFA pudieran estar involucrados en modular la biosíntesis del TRH en el NPV, ya que se encuentran elevados durante el tiempo del análisis. Esta hipótesis es apoyada por una correlación positiva entre la concentración de TG y NEFA en suero y el nivel del RNAm del TRH en el NPV del hipotálamo a las 4 h de tratamiento. Sin embargo, a las 2 h de iniciado el consumo de alimento, las correlaciones resultaron negativas entre la concentración de TG y NEFA y el nivel del RNAm del TRH sugiriendo que toma más de 2 h eliminar algún cambio generado posiblemente por el ayuno, ya que en los animales que consumieron la DR también se observó una correlación positiva entre el nivel del RNAm del TRH y la concentración de los TG y NEFA. Los ácidos grasos pueden atravesar la barrera hematoencefálica e interactuar con receptores como TNF α , TLR4, receptores acoplados a proteínas G (GPCR), transportadores específicos, etc, y activar las vías de señalización de ERK, JNK y cFos, para estimular diferentes tipos celulares en el SNC (Chudoba *et al.*, 2019; Tse *et al.*, 2017). Debido a que la DAG contiene grasa de cerdo, tiene una gran cantidad de ácido

palmítico y oleico, y se ha demostrado que estos ácidos grasos son responsables de regular la biosíntesis de otros péptidos en el hipotálamo (Schwinkendorf *et al.*, 2011; Tse *et al.*, 2017). Si bien no observamos cambios en la concentración de leptina en los tiempos analizados, determinamos una correlación positiva entre la concentración de esta hormona y el nivel del RNAm del TRH a las 4 h de consumo de DR y DAG. Lo que sugiere que este incremento de la leptina generado por el consumo de alimento puede estar afectando la síntesis del RNAm del TRH, alterada por la condición de ayuno. Efecto previamente reportado a tiempos más largos de ayuno (Nillni, 2010).

Es importante tomar en cuenta el incremento rápido y transitorio en la concentración circulante de corticosterona en respuesta al inicio del consumo de la DAG, el cual pudiera estar involucrado en regular la biosíntesis del TRH en el NPV, dado que la correlación entre la concentración de corticosterona y el nivel de RNAm del TRH es positiva en los grupos que consumieron DAG por 2 o 4 h, mientras que esto no se observa en los animales que consumieron DR. También se ha demostrado que la aplicación de corticosterona exógena en la rata es capaz de inducir un incremento en el nivel del RNAm del TRH en el NPV, 1 h después del tratamiento o el incremento de corticosterona observado en respuesta al aislamiento de 1 h (Uribe *et al.*, 2011; Sotelo-Rivera *et al.*, 2014).

La aplicación intraperitoneal de una emulsión de lípidos de cadena media y larga, en ratas con ayuno previo de 12 h elevó la concentración de TG en forma significativa con respecto al grupo control, a las 2 y 4 h de tratamiento. No obstante, se mostró un incremento menor con respecto a la respuesta por el consumo de DAG, resultados que coinciden con lo previamente reportado (Chang *et al.*, 2004). A diferencia de lo reportado por otros autores, con la aplicación i.p de intralipid, una solución de grasa con mayor concentración de lípidos de cadena larga saturada, el incremento en la concentración de NEFA en suero solo se observó a las 4 h de tratamiento. Aunado a esto, se mostró un incremento en la concentración de glucosa en suero a las 2 h de la inyección, que no se observa con el intralipid y el consumo de DAG. Dado que la solución de lípidos que empleamos tiene un 50% de triglicéridos de cadena media y contiene lípidos que no se encuentran en los otros tratamientos, suponemos que pudiera ser una de las razones del incremento en la concentración de glucosa en sangre, ya que se ha reportado que la administración de

triglicéridos de cadena media incrementa la producción de glucosa en recién nacidos con déficit de energía (Bougnères *et al.*, 1989). Sin embargo, cabe mencionar que existe controversia sobre el efecto de ácidos grasos de cadena media con respecto al metabolismo de la glucosa, ya que en otro estudio no se mostraron diferencias en la concentración de glucosa en suero (Hill *et al.*, 1990). Por otro lado, a pesar de que no observamos cambios significativos en la concentración de corticosterona en suero, se encontró concentración elevada de este glucocorticoide en los grupos que fueron inyectados con SSI a las 4 h y los tratados con lipofundin a las 2 y 4 h, lo cual podría sugerir que es una respuesta de los animales al tiempo de ayuno (16 h) y al tratamiento con la solución de lípidos. Si bien con la aplicación del lipofundin 20% logramos incrementar la concentración circulante de TG y NEFA, el nivel del RNAm del TRH en el NPV no cambió con respecto al grupo de animales inyectados con SSI. Tampoco observamos correlación entre el nivel del RNAm del TRH y la concentración de TG o NEFA en los grupos tratados, lo que sugiere que los TG o NEFA provenientes del lipofundin no participan en la regulación de la biosíntesis del TRH en el NPV. Dado que el lipofundin tiene aproximadamente el 50 % de ácidos grasos saturados comparado con la DAG que, si regula la biosíntesis del TRH en el NPV, será necesario determinar si los ácidos grasos de cadena larga y saturados como el ácido palmítico, están involucrados en regular el nivel del RNAm del TRH.

Una diferencia importante que debe ser considerada, es que los animales ayunados que consumieron la dieta DAG y DR obtuvieron un mayor aporte calórico que los que fueron inyectados con lipofundin 20%. Por lo que sería importante definir si las neuronas TRHérgicas del NPV, responden a un incremento en el consumo calórico. Sin embargo, cabe mencionar que en nuestro análisis obtuvimos una correlación negativa entre estos dos parámetros a las 4 h de consumo de DAG o DR. Aunado a esto, se ha reportado que es la composición de la dieta y no la ingesta calórica lo que altera rápidamente la excitabilidad de algunas poblaciones neuronales hipotalámicas (Wei *et al.*, 2015). También observamos que la aplicación de lipofundin no indujo un incremento en el nivel de la proteína c-Fos en el NPV 4 h después de la aplicación, mientras que el efecto si se observó en el ARC; este resultado también es opuesto a lo reportado por otros autores (Chang *et al.*, 2004), lo que apoya que los ácidos grasos de cadena media activan vías de señalización diferentes a los ácidos grasos de cadena larga. Debido a la distribución

que presentan las células positivas a cFos en el ARC, se sugiere que las neuronas que expresan el α -MSH y el CART (Fekete y Lechan, 2014) podrían ser neuronas candidatas positivas a c-Fos, y que respondieron a los ácidos grasos provenientes del lipofundin 20%.

En resumen, demostramos que moléculas que activan la vía de señalización de cFos no son responsables de inducir el incremento en el nivel del RNAm del TRH en el NPV, en respuesta al consumo de DAG por 3 días, y que los ácidos grasos provenientes de la DAG estimulan la biosíntesis del TRH en forma rápida.

10. CONCLUSIONES

- ❖ El consumo de DAG por períodos cortos de tiempo (h o días) induce la biosíntesis del TRH en el NPV de la rata macho.
- ❖ La proteína c-Fos no está involucrada en la inducción de la biosíntesis del TRH en el NPV en respuesta a la ingesta de DAG por 3 días.
- ❖ Otros tipos celulares del NPV responden a c-Fos en respuesta al consumo agudo de DAG durante 3 días.
- ❖ Los TG y NEFA generados por la ingesta de DAG pudieran modular en forma rápida el nivel del RNAm del TRH en neuronas del NPV.
- ❖ Las concentraciones de TG y NEFA en suero correlacionan positivamente con el nivel del RNAm del TRH en el NPV cuando este se encuentra elevado.
- ❖ La aplicación intraperitoneal de lipofundin 20% no altera la biosíntesis del TRH en el NPV del hipotálamo.
- ❖ La concentración de leptina en suero correlaciona positivamente con el nivel del RNAm del TRH a las 4 h de consumo de DR o DAG posterior a 12 h de ayuno.

11. PERSPECTIVAS

- ❖ Definir si el incremento del TNF- α en el hipotálamo en respuesta al consumo de DAG por 3 días es el responsable de regular la biosíntesis del RNAm del TRH en el NPV en esta condición.
- ❖ Repetir los experimentos de la cuantificación del RNAm del TRH en respuesta a la aplicación de lipofundin 20% y al consumo de DAG por 4 h.
- ❖ Determinar si el intralipid 20% (enriquecido en ácido palmítico y oleico) regulan el nivel del RNAm del TRH en el NPV en forma rápida.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abildgaard. A., Lund. S., Hougaard. K. (2014). Chronic high-fat diet increases acute neuroendocrine stress response independently of prenatal dexamethasone treatment in male rats. *Acta Neuropsychiatrica*. 26 (1): 8-18.
- Akabayashi. A., Koenig. JL., Watanabe. Y., Alexander. JT and Leobowitz. SF. (1994). Galanin-containing neurons in the paraventricular nucleus: a neurochemical marker for fat ingestion and body weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(22): 10375-9.
- Al-Assal. K., Martinez. AC., Torrinhas. RS., Cardinelli. C and Waitzberg. D. (2018). Gut microbiota and obesity. *Clinical Nutrition Experimental*. 20: 60-64.
- Araujo. RL., Andrade. BM., Padrón. AS., Gaidhu. MP., Perry. RL., Carvalho. DP *et al.*, (2010). High-Fat diet increases tryptroponin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T₃) and thyroxine in rats: The role of iodothyronine deiodinases, reverse T₃ production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology*. 151 (7): 3460-3469.
- Arnone. D., Chabot. C., Anne-Charlotte. H., Kokten. T., Caron. B *et al.*, (2022). Sugar and gastrointestinal health. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 20 (9): 1912-1924.
- Barber. JR and Verma. IM. (1987). Modification of fos proteins: Phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl- phorbol-13-acetate and serum. *Molecular and Cellular Biology*. 7 (6): 2201-2211.
- Bianco. AC and Kim. BW. (2006). Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *The Journal of Clinical Investigation*. 116 (10): 2571-2579.
- Bianco. AC and McAninch. EA. (2013). The role of thyroid and brown adipose tissue in energy homeostasis. *The Lancet. Diabetes and Endocrinology*. 1 (3): 250-258.
- Boelen. A., Wiersinga. WN and Fliers. E. (2008). Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid*. 18(2): 123-9.
- Boguszewski. CL and van der Lely. AJ. (2015). The role of the gastrointestinal tract in the control of energy balance. *Translational Gastrointestinal Cancer*. 4(1): 3-13.
- Bougnères. PF., Castaño. L., Rocchiccioli. F., Gia. PH., Leluyer. B *et al.*, (1989). Medium-chain fatty acids increase glucose production in normal and low birth weight newborns. *American Journal of Physiology*. 256 (5): 92-97.

- Brethauer. SA., Chand. B and Schauer. PR. (2006). Risks and benefits of bariatric surgery: current evidence. *Journal of Medicine*. 73 (11): 993-1007.
- Bruce. KD., Zsombok. A and Eckel. RH. (2017). Lipid processing in the brain: A key regulator of systemic metabolism. *Frontiers in Endocrinology*. 8 (1): 11.
- Camilleri. M. (2015). Peripheral mechanisms in appetite regulation. *Gastroenterology*. 148 (6): 1219-1233.
- Cano. P., Jiménez-Ortega. V., Larrad. A., Reyes-Toso. CF., Cardinali. DP *et al.*, (2008). Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-Stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. *Endocrine*. 33 (2): 118-125.
- Chambers. AP., Sandoval. DA and Seeley. RJ. (2014). Central nervous system integration of satiety signals. *Current Biology*. 23 (9): 379-388.
- Chang. GQ., Karatayev. O., Davydova. Z and Leibowitz. SF. (2004). Circulating triglycerides impact on orexigenic peptides and neuronal activity in hypothalamus. *Endocrinology*. 145 (8): 3904-3912.
- Chang. GQ., Karatayev. O., Ahsan. R., Gaysinskaya. V., Marwil. Z *et al.*, (2007). Dietary fat stimulates endogenous enkephalin and dynorphin in the paraventricular nucleus: role of circulating triglycerides. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 292(2): 561-570.
- Charli. JL., Vargas. MA., Cisneros. M., de Gortari, P., Baeza. MA., Jasso. P *et al.*, (1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: Role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6 (1): 45-57.
- Chen. X., Gong. Q., Chun-Yu. W., Zhang. K., Xiai. J *et al.*, (2016). High-fat diet induces distinct metabolic response in interleukin-6 and tumor necrosis factor- α knockout mice. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 36 (10): 580-588.
- Chou. TC., Scammell. TE., Gooley. JJ., Gaus. SE., Saper. CB and Lu. J. (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *Journal of Neuroscience*. 23 (33): 10691-10702.
- Chudoba. C., Wardelmann. K and Kleinridders. A. (2019). Molecular effects of dietary fatty acids on brain insulin action and mitochondrial function. *Biological Chemistry*. 400(8): 991–1003.

- Clemmensen. C., Muller. TD., Woods. SC., Berthoud. HR., Seeley. RJ and Tschop. MH. (2017). Gut-brain cross-talk in metabolic control. *Cell*. 168 (5): 758-774.
- Crescenzo. R., Mazzoli. A., Cancelliere. R., Bianco. F., Giacco. A *et al.*, (2017). Polyunsaturated fatty acids stimulate de novo lipogenesis and improve glucose homeostasis during refeeding with high fat diet. *Frontiers in Physiology*. 8:178-187.
- Cruz-Mendoza. F., Jauregui-Huerta. F., Aguilar-Delgadillo. A., Garcia-Estrada and Luquin. S. (2022). Immediate early gene c-Fos in the brain: focus on glial cells. *Brain Sciences*. 12 (6): 687-204.
- Curran. T and Morgan. JI. (1995). Fos: An immediate-early transcription factor in neurons. *Neurobiology*. 26 (3). 403-412.
- Dalvi. PS., Chalmers. JA., Luo. V., Han. D-YD., Welhauser. L *et al.*, (2017). High fat induces acute and chronic inflammation in the hypothalamus: effect of high-fat diet, palmitate and TNF- α on appetite-regulating NPY neurons. *International Journal of Obesity*. 41 (1): 149-158.
- DiBonaventura. MD., Meincke. H., Lay. AL., Fournier. J., Bakker. E and Ehrenreich. (2018). Obesity in Mexico: prevalence, comorbidities, associations with patient outcomes, and treatment experiences. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 11 (1): 1–10.
- Diéguez. C., Frühbeck. G and López. M. (2009). Hypothalamic lipids and the regulation of energy homeostasis. *Obesity Facts*. 2 (2): 126-135.
- Diéguez. C., Vázquez. MJ., Romero. A., López. M and Nogueiras. R. (2011). Hypothalamic control of lipid metabolism: focus on leptin, ghrelin and melanocortins. *Neuroendocrinology*. 94 (1):1–11.
- DiRienzi. SC and Briton. RA. (2020). Adaptation of the gut microbiota to modern dietary sugars and sweeteners. *Advances in Nutrition*. 11(3): 616-629.
- Douglass. JD., Dorfman. MD., Fasnacht. R., Shaffer. LD and Thaler JP. (2017). Astrocyte IKK β /NF-KB signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Molecular Metabolism*. 6 (4):366-373.
- Dube. MG., Kalra. SP and Kalra. PS. (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Research*. 842 (2): 473–477.

- Fekete. C., Sarkar. S., Rand. WM., Harney. JW., Emerson. CH., Bianco. AC *et al.*, (2002^a). Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*. 143(12):4513-9.
- Fekete. C., Sarkar. S., Rand. WM., Harney. JW., Emerson. CH., Bianco. AC *et al.*, (2002^b). Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology*. 143(10): 3846-53.
- Fekete. C., Marks. DL., Sarkar. S., Emerson. CH., Rand. WM *et al.*, (2004). Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology*. 145 (11): 4816-4821.
- Fekete. C and Lechan. RM. (2007). Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deidnase. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 28 (2-3): 97-114.
- Fekete. C and Lechan. RM. (2014). Central regulation of hypothalamic-Pituitary- Thyriod axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*. 35 (2): 159-194.
- Ghanemi. A and St-Amand. J. (2018). Redefining obesity toward classifying as a disease. *European Journal of Internal Medicine*. 55: 20-22.
- Glass. MJ., Chan. J and Pickel. VM. (2017). Ultrastructural characterization of tumor necrosis factor alpha receptor type 1 distribution in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse. *Neuroscience*. 352: 362-272.
- González. JA., Lordanidou. P., Strom. M., Adamantidis. A and Burdakov. D. (2016). Awake dynamics and brain-wide direct inputs of hypothalamic MCH and orexin networks. *Nature Communications*. 7: 11395-113104.
- Guerra-Crespo. M., Uribe. R., Joseph-Bravo. P., Charli. JL and Perez-Martinez. L. (2001). BDNF increases the early expression of TRH RNAm in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *The European Journal of Neuroscience*. 14 (3): 483-494.
- Guo. F., Bakal. K., Minokoshi. Y and Hollenberg. AN. (2004). Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology*. 145 (5): 2221-2227.

- van Hastereen. GA., Linkels. E., Klootwijk. W., van Toor. H., Rondeel. JM., Themmen. AP *et al.*, (1995). Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) RNAm and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *The Journal of Endocrinology*. 145 (1):143-153.
- Heuer. H., Schäfer. M., O'Donnell. D., Walker. P and Bauer. K. (2000). Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *The Journal of Comparative Neurology*. 428 (2): 319-336.
- Hill. JO., Peters. JC., Swift. LL., Yang. D., Sharp. T *et al.*, (1990). Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides. *Journal of Lipid Research*. 3 (3): 407-416.
- Hoffman. GE., Smith. MS and Verbalis. JG. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Neuroendocrinology*. 14 (3): 173-213.
- Houten. SM., Violante. S., Ventura. FV and Wanders. RJA. (2016). The biochemistry and physiology of mitochondrial fatty acid β -Oxidation and its genetic disorders. *Annual Review of Physiology*. 78: 23-44.
- Hruby. A and Hu. FB. (2015). The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharmacoeconomics*. 33(7): 673-89.
- Jais. A., Paeger. L., Sotelo-Hitschfeld. T *et al.*, (2020). PNOC^{ARC} neurons promote hyperphagia and obesity upon high-fat-diet feeding. *Neuron*. 106 (6): 1–17.
- Joseph-Bravo. P., Cote-Velez. A and Perez-Martinez. L (2006). Integration of neuroendocrine signals that regulate the activity of hypophysiotropic peptides. *Molecular Endocrinology*. 1-24.
- Joseph-Bravo. P., Jaimes-Hoy. L and Charli. JL. (2015). Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *Journal of Endocrinology*. 224 (3): 139-159.
- Kakucska. I., Qi. Y and Lechan. RM. (1995). Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 136 (7): 2795-2802.

- Kim. MS., Small. CJ., Stanley. SA., Morgan. DG., Seal. LJ *et al.*, (2000). The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary-thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *Journal of Clinical Investigation*. 105 (7) : 1005-1011.
- Kimura. I., Ichimura. A., Ohue-Kitano. R and Igarashi. M. (2020). Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiological Reviews*. 100 (1): 171-210.
- Kleinridders. A., Könner. AC., Brüning. JC. (2009). CNS-targets in control of energy and glucose homeostasis. *Current Opinion in Pharmacology*. 9 (6): 794-804.
- Koller. KJ., Wolff. RS., Warden. MK and Zoeller. RT. (1987). Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(20): 7329-33.
- Lechan. RM and Fekete. C. (2006). The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*. 153: 209–235.
- Lenard. NR and Berthoud. HR. (2008). Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obesity*. 16(3): 11–22.
- Lin. L., Martin. R., Schaffhauser. AO and York. DA. (2001). Acute changes in the response to peripheral leptin with alteration in the diet composition. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative, and Comparative Physiology*. 280 (2): 504-509.
- Livak. KJ and Schmittgen. TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*. 25 (4): 402-408.
- López. M., Alvarez. CV., Nogueiras, R and Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*. 19 (7): 418-427.
- Marcus. JN., Aschkenasi. CJ., Lee. CE., Chemelli. RM., Saper. CB., Yanagisawa *et al.*, (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology*. 435(1): 6-25.
- Merchenthaler. L and Liposits. Z. (1994). Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biologica Hungarica*. 45 (2-4): 361-374.

- Mitchell. RW., Ngoc. HO., Del Bigio. MR., Miller. DW and Hatch. GM. (2011). Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *Neurochemistry*. 117 (4): 735-746.
- Mohammed. MS., Sendra. S., Lloret. J and Bosch. I. (2018) "Systems and WBANs for controlling obesity". *Journal of Healthcare Engineering*. 2018: 21.
- Mullur. R., Yan-Yun. L and Brent. GA. (2014). Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological*. 94 (2): 355-382.
- Murakami. M., Kamiya. Y., Morimura. T., Araki. O., Imamura. M *et al.*, (2001). Thyrotropin receptors in brown adipose tissue: thyrotropin stimulates type II iodothyronine deiodinase and uncoupling protein-1 in brown adipocytes. *Endocrinology*. 142 (3): 1195-201.
- Nillni. EA. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31(2): 134-156.
- Nakamura. MT., Yudell. BE and Loor. JJ. (2014). Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*. 53: 124-144.
- Nowland. MH., Hugunin. MS and Rogers. KL. (2011). Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawley rats. *Comparative Medicine*. 61 (2): 138-144.
- Parra-Rojas. I., Del Moral-Hernandez. O., Salgado-Bernabé. AB., Guzman-Guzman. IP., Salgado-Goytia. L and Muñoz-Valle. JF. (2013). Adenovirus-36 seropositivity and its relation with obesity and metabolic profile in children. *International Journal of Endocrinology*. 2013.463194.
- Perello. M., Stuart. R and Nillni. EA. (2006). The role of intracerebroventricular administration of leptin in the stimulation of prothyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 147 (7): 3296-3306.
- Perello. M., Cakir. I., Cyr, NE., Romero. A., Stuart, RC., Chiappini. F *et al.*, (2010). Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 299 (6): 976-998.

- Pérez-Martínez. L., Carreón. A and González. ME. (1998). Dexametasone rapidly regulates TRH RNAm levels in hypothalamic cell cultures: interactions with cAMP pathway. *Neuroendocrinology*. 68 (5): 345-354.
- Pfaffl. MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29 (9): 45-51.
- Ponterio. E and Gnessi. L. (2015). Adenovirus 36 and Obesity: An Overview. *Viruses*. 7 (7): 3719-3740.
- Pulsalkar. M., Surin. D., Kelkar. A., Bhattacharya., Galande. S and Vaidya.VA. (2015). Early stress evokes dysregulation of histone modifiers in the medial prefrontal cortex across the life span. *Developmental Psychobiology*. 58 (2):198-210.
- Rakvaag. E., Lund MD., Wiking. L., Hermansen. K., Gregersen. S. (2019). Effects of different fasting durations on glucose and lipid metabolism in Sprague Dawley rats. *Hormone and Metabolic Research*. 51 (8): 546-553.
- Ramírez-Badillo. MA. (2011). Regulación de la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) en el hipotálamo de ratas macho obesas. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya, México.
- Ramírez-Bustos. MA. (2018). Papel de la leptina en la regulación de la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotropina en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo de ratas obesas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Ramírez-Bustos. MA., Cisneros. M., Joseph-Bravo. P., Charli. JL y Uribe. RM. (2019). Influencia de la leptina sobre la regulación de la biosíntesis de TRH en las neuronas TRHérgicas del NPV en respuesta a balance energético positivo inducido por dieta en la rata macho adulta. Comunicación presentada en la semana académica. Instituto de Biotecnología-UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Reginato. A., Costa-Veras. AC., Baqueiro. MN., Panzarin. C., Siqueira. BP *et al.*, (2021). The role of fatty acids in ceramide pathways and their influence on hypothalamic regulation of energy balance: A systemic review. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (10): 5357-5397.
- Romanatto. T., Cesquini. M., Amaral. ME., Roman. EA., Moraes. JC *et al.*, (2007). TNF- α acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory

- quotient-effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides*. 28 (5): 1050-1058.
- Rondeel. JM., Greef. WJ., Klootwijk. W and Visser. TJ. (1992). Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology*. 130 (2):651-656.
- Sánchez. E., Uribe. RM., Corkidi. G., Zoeller. RT., Cisneros. M *et al.*, (2001). Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 74 (6): 407-422.
- Sánchez. E., Vargas. MA., Singru. PS., Pascual I., Romero. F., Fekete. C., Lechan. RM. (2009). Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 150 (5): 2283–2291.
- Sanz. Y., Santacruz. A and Gauffin. P. (2010). Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proc Nutr Soc*. 69(3): 434-41.
- Sarkar. S and Lechan. RM. (2003). Central administration of neuropeptide Y reduces melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 144(1): 281–291.
- Schauder. B., Schomburg. L., Köhrle and Bauer. K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (20): 9534–9538.
- Schmitmeire. S., Thole. H., Bader. A and Bauer. K. (2002). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *European Journal of Biochemistry*. 269 (4): 1278-1286.

- Schneeberger. M., Gomis. R and Claret. M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *Journal of Endocrinology*. 220 (2): T25-46.
- Schwinkendorf. DR., Tsatsos. NG., Gosnell. BA., and Mashek. DG. (2011). Effects on central administration of distinct fatty acids on hypothalamic neuropeptide expression and energy metabolism. *International Journal of Obesity*. 35 (3): 336-344.
- Segerson. TP., Kauer. J., Wolfe. HC., Mobtaker. H., Wu. P., Jackson. IM and Lechan. RM. (1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 238 (4823): 78-80.
- Sergi. D and Williams. LM. (2020). Potential relationship between dietary long-chain saturated fatty acids and hypothalamic dysfunction in obesity. *Nutrition Reviews*. 78 (4): 261-277.
- Small. CJ., Liu. YL., Stanley. SA., Connoley IP., Kennedy. A., Stock. MJ y Bloom SR. (2003). Chronic CNS administration of agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 27(4): 530-3.
- Sotelo-Rivera. I., Uribe. RM., Charli. JL and Joseph-Bravo. P. (2014). Glucocorticoids curtail cAMP-induced TRH transcription by a protein: protein interaction between glucocorticoid receptor and catalytic PKA. *Neuroendocrinology*. 55 (3): 861-869.
- Stanley. S., Wynne. K., McGowan. B and Bloom. S. (2005). Hormonal regulation of food intake. *Physiological Reviews*. 85 (4): 1131-1158.
- Sundaresan. S and Abumrad. NA. (2015). Dietary lipids inform the gut and brain about meal arrival via CD36-mediated signal transduction. *Nutrition*. 145 (10): 2195-2200.
- Thaler. JP., Chun-Xia. Y., Ellen. AS., Guyenet. SJ., Hwang. BH *et al.*, (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*. 122 (1): 153-162.
- Toni. R and Lechan .RM. (1993). Neuroendocrine regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the tuberoinfundibular system. *Journal of Endocrinological Investigation*. 16(9): 715-753.

- Torres-Reyes M. P. (2014). Regulación de los sistemas TRHérgicos del hipotálamo durante la obesidad inducida por dieta alta en grasa en la rata. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Trujillo-Alonso. V. (2001). Papel de la noradrenalina en la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el núcleo paraventricular del hipotálamo de rata en respuesta al estrés por frío. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Tse. KE., Salehi. A., Clemenzi. MN and Belshan. DD. (2017^a). Role of the saturated fatty acid palmitate in the interconnected hypothalamic control of energy homeostasis and biological rhythms. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*. 315 (2):133-140.
- Tse. KE and Belsham DD. (2017^b). Palmitate induces neuroinflammation, ER stress, and *Pomc* mRNA expression in hypothalamic mHypoA-POMC/GFP neurons through novel mechanisms that are prevented by oleate. *Molecular and cellular Endocrinology*. 472: 40-49.
- Ubieta. R., Uribe. RM., González. JA., García-Vázquez, Pérez-Monter. C *et al.*, (2007). BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway. *Brain Research*. 1174: 28-38.
- Ueno. H and Nakazato. M. (2016). Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *Journal of Diabetes Investigation*. 7 (6): 812-818.
- Unger. TJ., Calderon. GA., Brabley. LC., Sena-Esteves. M and Ríos. M. (2007). Selective deletion of *Bdnf* in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *Journal of Neuroscience*. 7(52): 14265–14274.
- Uribe. RM., Pérez-Martínez. L., Covarrubias .ML., Gomez. O., Covarrubias. L *et al.*, (1995). Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neuroscience Letters*. 201 (1): 41-44.
- Uribe. RM., Lee. S and Rivier. C. (1999). Endotoxin stimulates nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus through nitric oxide synthase I:

- correlation with hypothalamic pituitary-adrenal axis activation. *Endocrinology*. 140 (12): 5971-5981.
- Uribe. RM., Cisneros. M., Vargas. MA., Lezama. L., Cote-Velez. A *et al.*, (2011). The systemic inhibition of nitric oxide production rapidly regulates TRH mRNA concentration in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and serum TSH concentration. Studies in control and cold-stressed rats. *Brain Research*. 1367: 188-197.
- Vandesompele. J., De Preter. K., Pattyn. F., Poppe. B., Van Roy. N *et al.*, (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3 (7): research0034.1–0034.11.
- Watson. C and Paxinos. G. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, California. *Academic press*, INC.
- Wei. M., Pham. K., Gammons. JW., Sutherland. D., Liu. Y *et al.*, (2015). Diet composition, not calorie intake, rapidly alters intrinsic excitability of hypothalamic AgRP/ NPY neurons in mice. *Scientific Reports*. 5(1): 16810-20.
- Wittmann. G., Füzesi. T., Singru. PS., Liposits. Z., Lechan. RM and Fekete. C. (2009). Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Comparative Neurology*. 515 (3): 313-330.
- Xu. B., Goulding. EH., Zang. K., Cepoi. D., Cone. RD., Jones. KR *et al.*, (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature Neuroscience*. 6(7): 736 –742.
- Yeo. GS., Connie Hung. CC., Rochford. J., Keogh. J., Gray. J., Sivaramakrishnan. S *et al.*, (2004). A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nature Neuroscience*. 7: 1187–1189.
- Youngson. NA and Morris. MJ. (2013). What obesity research tells us about epigenetic mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368(1609): 20110337.
- Zhao. YF. (2022). Free fatty acid receptors in the endocrine regulation of glucose metabolism: insight from gastrointestinal-pancreatic-adipose interactions. *Frontiers in Endocrinology*. 13: 956277.
- Zhou. Y and Rui. L. (2013). Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of Medicine*. 7 (2): 207-222.

13. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de material para trabajar con RNA

Es importante que todo el material que se utilice en la preparación de las soluciones esté libre de RNAsas. Para lo cual, el material de vidrio y metal fue horneado al menos 3 h a 180 °C, el material de plástico fue nuevo y estéril. Todo el material que no puede ser horneado fue tratado con RNaseZap (Sigma), enjuagado y autoclaveado. Todas las soluciones fueron preparadas con agua grado Milli Q, filtrada por 0.22 µm, que fue recuperada directamente en botellas de vidrio previamente horneadas por 3 h a 180 °C y autoclaveadas. El agua libre de RNAsas se preparó, empleando agua grado Milli Q estéril que fue tratada (1 mL/L) con dietil pirocarbonato al 97% (DEPC, Sigma), con agitación durante 12 h. Posteriormente, se realizaron 2 ciclos de esterilización para eliminar el DEPC. Finalmente se guardó en alícuotas pequeñas a 4 °C.

Anexo 2. Purificación del RNA total del núcleo paraventricular del hipotálamo empleando un kit de QIAGEN

Los tejidos del NPV que previamente habían sido disecados, se sacaron de -70 °C en hielo seco, para disgregar el tejido se utilizó un sonicador (Ultrasonic Homogenizer 4710). Antes de empezar a procesar las muestras, el vástago del sonicador se lavó con RNaseZap y se enjuagó con agua libre de RNAsas, el exceso de agua se eliminó con una gasa estéril. Posteriormente, se homogenizó el tejido con 300 µL de buffer RLT (10 µL de β-mercaptoetanol/1 mL de buffer RLT), el lisado se centrifugó por 3 min a máxima velocidad en una microcentrifuga (Eppendorf) y a continuación se realizó la eliminación del gDNA mediante la transferencia del homogenado a la columna que se colocó sobre un tubo de 2 mL sin tapa. El homogenado se centrifugó por 30 seg a 10 000 rpm y se recolectó el sobrenadante, al cual se le añadió un volumen de la solución de homogenización de etanol al 70%, se mezcló con la pipeta, se transfirió la muestra a la columna para recuperar el RNA (RNeasy MinElute) y se centrifugó a 10 000 rpm por 15 seg. El sobrenadante se retiró y se agregaron 700 µL de buffer RW1 en la columna, se cerró la tapa y se centrifugó a 10 000 rpm durante 15 seg. Nuevamente, eliminamos el sobrenadante y agregamos 500 µL de buffer RPE en la columna, se cerraron los tubos y se centrifugaron 15 seg a 10 000 rpm. Eliminamos el sobrenadante y agregamos 500 µL de etanol al 80% en la columna, se taparon los tubos y se centrifugaron por 2 min a 10 000 rpm, este proceso se repitió 3 veces. Las columnas se transfirieron a tubos nuevos, se retiró la tapa y se centrifugaron por 5 min a máxima velocidad para evaporar los restos de alcohol (se debe tener cuidado porque muchas veces las tapas de los tubos se rompen). Las columnas se transfirieron a nuevos tubos y se agregaron 14 µL de agua libre de RNAsas en el centro de la columna, se cerró la tapa y se centrifugaron 1 min a 13 500 rpm, se agregaron 3 µL más de agua libre de RNAsas y se repitió el proceso. Inmediatamente después los tubos se colocaron en hielo y se determinó la cantidad de RNA por espectrofotometría.

Anexo 3. Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar Han

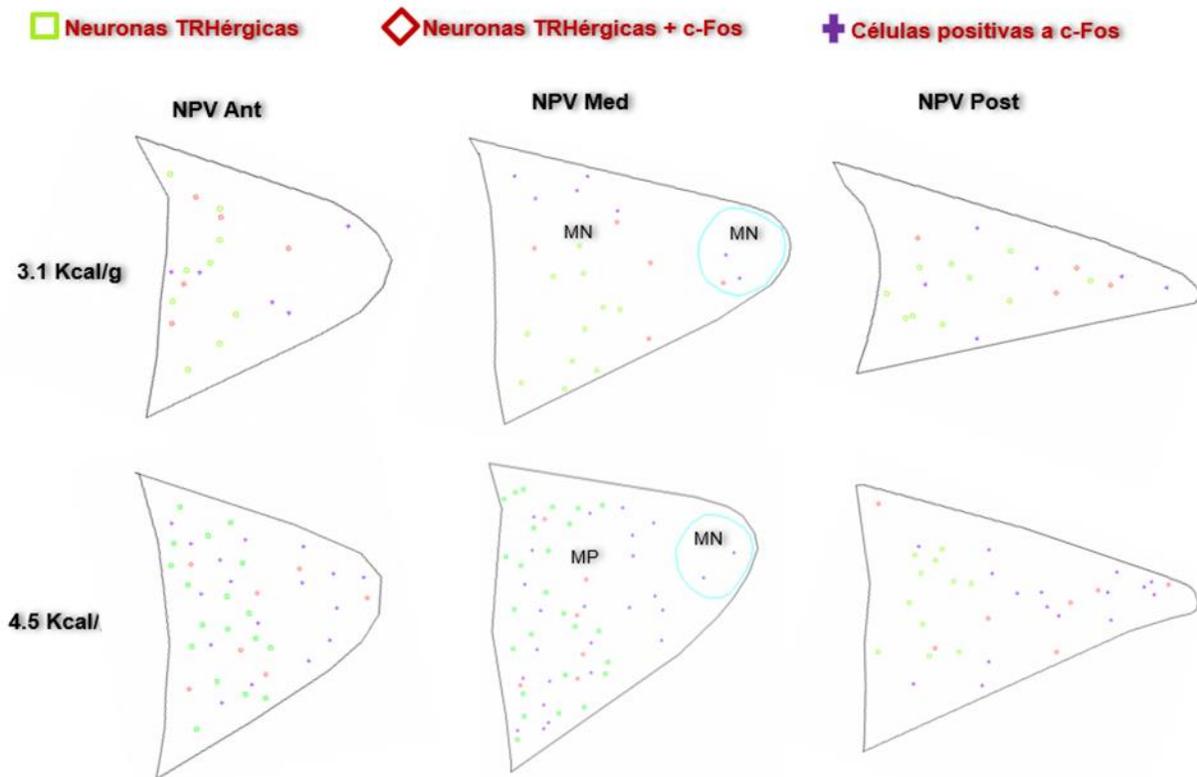


Figura 18. Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar Han. Se muestra la distribución de células positivas en la región anterior, media y posterior del hipotálamo de ratas Wistar Han alimentadas con diferentes dietas (3.1 Kcal/g y 4.5 Kcal/g), durante 3 días.

Anexo 4: Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar IGS

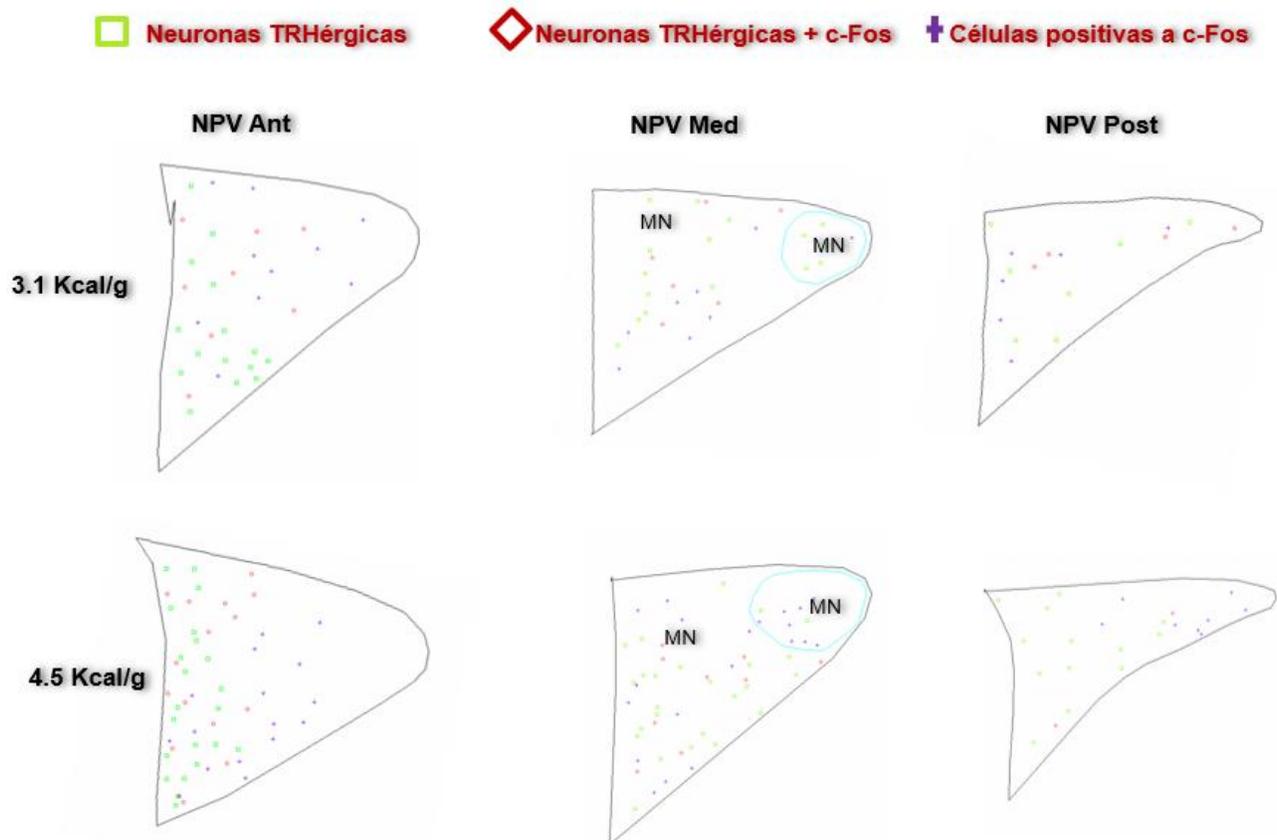


Figura 19: Maquetas representativas de la distribución de las neuronas TRHérgicas, neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos y células positivas a c-Fos en la cepa Wistar IGS. Se muestra la distribución de células positivas en la región anterior, media y posterior del hipotálamo de ratas Wistar IGS alimentadas con diferentes dietas (3.1 Kcal/g y 4.5 Kcal/g), durante 3 días.

Anexo 5. Coeficientes de correlación de Pearson

Tabla 11. Efecto del consumo de DR y DAG sobre el coeficiente de correlación de Pearson.

	DR 4 h	DAG 2 h	DAG 4 h
RNA _m del TRH vs TG	0.4	-0.6	0.7
RNA _m del TRH vs NEFA	0.6	-0.9	0.8
RNA _m del TRH vs Corticosterona	0.01	0.9	0.6
RNA _m del TRH vs Leptina	0.6	-0.3	0.8
RNA _m del TRH vs Kcal	-0.6	-0.09	-0.2

Tabla 12. Efecto de la inyección intraperitoneal de SSI y lipofundin sobre el coeficiente de correlación de Pearson.

	SSI 2 h	Lipofundin 2 h	SSI 4 h	Lipofundin 4 h
RNA _m del TRH vs TG	-0.6	-0.3	0.7	0.2
RNA _m del TRH vs NEFA	-0.1	-0.2	-0.4	0.05
RNA _m del TRH vs Corticosterona	-0.09	-0.7	-0.3	0.6
RNA _m del TRH vs Leptina	-0.3	0.6	0.8	-0.5
TG vs células positivas a cFos en el NPV			-0.4	-0.1
NEFA vs células positivas a cFos en el NPV			-0.6	0.7

Coeficiente de correlación (r)

≤ 0= Correlación negativa

.3 a .5= Correlación positiva moderada

.7 a 1= Correlación positiva muy fuerte

0 a .3= correlación positiva débil

.5 a .7= Correlación positiva fuerte



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO
COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **DETERMINAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RESPONSABLES DE ACTIVAR A LAS NEURONAS TRHÉRGICAS DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO EN RESPUESTA AL CONSUMO AGUDO DE DIETA RICA EN GRASA EN LA RATA MACHO ADULTA**, que presenta la alumna **Marlen Asucena Ramírez Bustos (10033421)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. María Angélica Santana Calderón CIDC-UAEM	APROBADO	
Dra. Roberta Salinas Marín CIDC-UAEM	APROBADO	
Dr. Jean-Louis Joseph Marie Charli Casalonga IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Juan José Acevedo Fernández Facultad de Medicina- UAEM	APROBADO	
Dra. Rosa María Uribe Villegas IBT-UNAM	APROBADO	



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ROBERTA SALINAS MARIN | Fecha:2023-06-14 20:49:48 | Firmante

BxP+Hpngkcd8+Xc57twEq2qGUpdSJoWvwxzDUFZLnv2Q/ZdGvl+A97N79svqesGtgvXbuk0EUgomywWiiWFPud/yx29bfOeBMJLoFmPsJ6YDf+yFp7mG56hMgTuf2unL9GgerHmD8/gL3QKtly+4BemkvJZZVAifsU12QcnRaaBlbvp3FN7m1oqO/zEJ5QvHze1QQ+ZN0yA5OSWJwbzbnVjzYnyuuVz2fOflRTsZUxla/wZqCrEdqSAN9WXY8B1Mu10qsXS/uv07qbeGxoiElr76xZQPkeChPqz38zjtZ0TdzQDjkSG1VsYHXyFAQjueGcXDN4RYQVkgwrrqQflHg==

MARIA ANGELICA SANTANA CALDERON | Fecha:2023-06-15 09:40:24 | Firmante

Ar0zC8KlqRjCAG7AvlrLLIHnto0rl7guxS5EDhcbZSUBxw6BPNdN9I4cAY3wHmjaTLUAXtcKDRXLtqICFEWbqPJBcMinDBycowM2GO/WliyDssjqdBflytXNxtUZApTckedmQ0Wt/Sm8lt1NZmJj+IUwTmNmmq7kNXw3Eq4PbHAOn4OHVV1SJJ3H8bRZ2SFISadIE7SYIEgjYJTSM3t+W9B4x+sL1qhB+Mf1FuNFcXtyTz7V2owbCABmTq6I8gRAMS0ZSwXSRd9QbARsdzEgqcUX9pFEASIH8OUa6+PKFa0k+n8H5Z7K1EHINHqkxDna0YqQexips+ejyDpHnOPA==

ROSA MARÍA URIBE VILLEGAS | Fecha:2023-06-15 10:03:34 | Firmante

PbXiURnyb8nZKhBNdqJBARlJFvQ6ijPmi8Je3pegGyGQ4XDjxJ+x42y9E8sBv4hxNquaydlZo+ml6ce2alxIOdcl68y7U5ZwF4hu2KdHI4RRBkd24N4Z+yB5ctoTRxEMX1WG0xmOOAL3iyknCowCUVRyIS4iBQNYkRAEpokcYx4Ua0vxxqOC65LmnLNVbhMSgKKCH7iNhHRDL4S7e0VSAVIOI6oXivHH7w8EDxcSSRgtv+9Bi48LZRm4JacPJRYvtymn/siAISPCRSIYA7U8VQCLUnzoE0/bZ5EPRPF5Y366/gY0cdwAmgg574/jQO24aeV1ImfUvFruT2f6yQ==

JEAN-LOUIS JOSEPH MARIE CHARLI CASALONGA | Fecha:2023-06-15 11:36:21 | Firmante

NZ2GAR4UvRtW31Vm6ssM9EV7DiwSjvxxlr+s+oFQ55bqRbRNW7p7r0ORyBgIzFg8KFxSGY+fPXgpmn7WwqDKhlfnyY0iszlROqqvHFfKuriHv5F60zi3UFEL7gHL4fu8PpXCEvW1t1nV5OQaNOZ0cdBemLR9H0xXtPdsNe7C7z6CTybM6yNXRCSpDPydBT2eNedcuYYvq07Rjw2OU/yXXb1wRAtC+CmGeTc/NtncbBioknyeNEMJupS3+qqS7IIAYzY5plGpijdSYZ2nj5IbARODAFkoOgroW0QRw2jg73goFlrs318wAgZKhhL1IQtdQqIBV+WqGGsofiAF6xz4A==

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2023-06-15 12:53:39 | Firmante

gHE8G8LqB/+vZuhVygVNXhFpA5vFvWQPQvZhbTxeOEWoRV2u47nwArFybM7uXZzWTVzUeDuZxWtaYyvr19fAvSIXFGB4EnhOk26tXorHn3MjfrJdWLiC16EUzyO4S2qa1JCyKPP3sKazJ+fo1k9EcpEWop82LjyU1CvhFRw4fFt+EeRxfN51X4UISc8EPLy7J+Q91KwjM4nFzn8zF6BndB9doj22i2YotKmhqk/DSLkz8xjoekcoe9px9R/EznnMzESmKQ5y5co1rbPQgoSDdfjBUfAcxpNEQIPgV3tbD169Es2C3EX+DFvqeP0RvV0tbU/RZG2Znr/xOxN1MbFLg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



JsSopL5qM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Yo8gUAck267tcRJl4fb75j7o1Xv56VEe>

