



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Nutrición

**EFFECTOS DE LA GALANINA COMO PÉPTIDO (GALP) EN LA TASA
METABÓLICA, TEMPERATURA CORPORAL E INGESTA EN RATAS**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciado en Nutrición

Presenta:

Carla Rodríguez Dimitrescu

Director de tesis:

M en C Ángeles Aguilera Barreiro

No. ADG H71260

CLAS IS

619.93

R696e



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Nutrición

EFFECTOS DE LA GALANINA COMO PÉPTIDO (GALP) EN LA TASA METABÓLICA, TEMPERATURA CORPORAL E INGESTA EN RATAS

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Nutrición

Presenta:

Carla Rodríguez Dimitrescu

Dirigido por:

M en C Ángeles Aguilera Barreiro

SINODALES

M en C Ángeles Aguilera Barreiro
Director

Ph D Gregory S. Fraley
Asesor

M en C Diana Beatriz Rangel Peniche
Asesor

M en C María del Rocío Arellano Jiménez
Asesor

L.N. Elizabeth Elton Puente
Coordinadora de la Lic en Nutrición


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

RESUMEN

Efectos de la Galanina como Péptido (GALP) en la tasa metabólica, temperatura corporal e ingesta en ratas

Introducción: Para entender diversos desórdenes metabólicos se realizó el presente estudio sobre un nuevo neuropéptido denominado Galanina como Péptido (GALP) descubierto en 1999, cuya presencia parece estar relacionada con cambios en la ingestión dietética y metabolismo. **Objetivo:** Definir el efecto del GALP en la tasa metabólica, ingestión y temperatura corporal en ratas Sprague-Dawley, así como la respuesta que la administración del GALP produce en la actividad de los roedores. **Material y métodos:** Se llevó a cabo una prueba piloto y el experimento propiamente, para la prueba piloto se utilizaron 12 ratas Sprague-Dawley, en el experimento se utilizaron 16 ratas Sprague-Dawley; en ambos experimentos las ratas se dividieron en dos grupos (control y estudio o experimental) con miras a realizar una experimentación del tipo doble cruzado. A las ratas se les implantaron cánulas intracerebroventriculares. Posteriormente se les inyectó 5 nmol de GALP ó 3.0 µl de fluido cerebroespinal artificial (aCSF), el cual no tiene efecto alguno en la ingestión y metabolismo de las ratas. El consumo de oxígeno para cada ejemplar fue cuantificado durante 8 horas (cada 5 minutos); la ingestión y actividad se monitorearon por espacio de 23 horas, una hora después de terminado el monitoreo se pesaba cada rata. En este estudio el consumo de oxígeno permitió estimar la tasa metabólica de los animales. El análisis estadístico fue mediante SYSTATII 2004 y Sigma Plot. **Resultados:** El GALP incrementó significativamente el consumo de oxígeno ($p < 0.05$), sin producir un aumento en la actividad. En lo referente a la ingestión los resultados mostraron que el GALP tuvo un efecto inicial orexigénico seguido por un efecto anorexigénico mantenido durante las 24 horas post-inyección. El efecto global observado es ligeramente anorexigénico. **Conclusiones:** Se demostró que la administración del GALP a través de las cánulas intracerebroventriculares estimula el metabolismo, esto no se relaciona con el incremento de la actividad motora y es independiente de la ingestión. Los resultados sugieren que el neuropéptido incrementa el gasto energético y podría jugar un papel importante en la regulación hipotalámica del peso corporal.

Palabras clave: Galanina como Péptido (GALP), neuropéptido, metabolismo, hipotálamo.

ABSTRACT

Galanin Like Peptide (GALP) effects on metabolic rate, body temperature and food intake in adult male rats.

Introduction: In order to understand the neural regulation of metabolism and energy homeostasis, the effects of a novel neuropeptide named galanin-like peptide (GALP) were investigated. GALP was discovered in 1999 and is associated with the metabolic regulation of food intake and reproduction. **Objective:** To determine if central GALP alters metabolic rate, food intake, body temperature and/or motor activity in adult male Sprague-Dawley rats. **Material and methods:** Twelve male rats were used during the pilot test while in the second experiment sixteen rats were used. Both were implanted with intracerebroventricular (i.c.v) canulas. After a week of surgical recovery, rats were injected with either 5 nmol of GALP or 3.0 μ l of artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Treatments were repeated one week later in a cross over design. Within five minutes of injection, oxygen consumption was quantified during 8 hours (each 5 minutes), food intake and activity were checked for 23 hours and body weight was recorded 24 hours after injection. In this study the oxygen consumption was used to estimate the animals' metabolic rates. Statistic analyses were made via repeated measures ANOVA using SYSTAT II 2004 and Sigma Plot (a $p < 0.05$ was considered significant). **Results:** GALP significantly increased the oxygen consumption ($p < 0.05$) compared to controls without increasing overall motor activity. Centrally administered GALP initially increased food intake but then reduced food intake and body weight over the next 24 hr period compared to controls (similarly to that described in numerous other studies). **Conclusions:** It was demonstrated that central GALP administration increases metabolic rate, which is not related to the physical activity. These data suggest that GALP increases metabolic rate and suggests that GALP is an important mediator in the hypothalamic control of body weight regulation and energy homeostasis.

Key words: Galanin Like Peptide (GALP), neuropeptide, metabolism, hypothalamus

DEDICATORIAS

A Micha, Mauchi, Beauty y a Omar por creer tanto en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Hope College, Michigan, USA; lugar en donde se realizó la investigación, así mismo a Merck por el apoyo económico a Hope College, a NSF REU con el subsidio DBI-0139035 al departamento de Biología de Hope College y al subsidio NIH KO1-DK-066238 otorgado al Ph. D Gregory S. Fraley, ya que sin todo este apoyo económico la investigación no hubiera sido posible.

Al Dr. Gregory S. Fraley y al Dr. Christopher C. Barney por su paciencia y por lo mucho que me enseñaron cuando estuve en Hope College.

A Lindy Babcock por haber sido mi compañera de proyecto de investigación, a Erin Holwerda por su paciencia y buen humor en el laboratorio, Marlie Johnson y Angela Stoyanovitch por enseñarme a hacer las cirugías en las ratas.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por establecer el vínculo con Hope College y financiar parte de mi estancia.

A la Dra. Hilda Romero Zepeda, por apoyarme durante todo el proceso de estancia en Hope College, así mismo agradezco a mis asesores y director de Tesis.

A Micha por ayudarme en todo, todo, gracias papi por ayudarme en la tesis y más aún por esforzarte en entender de verdad mi tema de tesis (pese a que es un tema algo raro) y por levantarme el ánimo siempre que lo he necesitado.

A Mami por ser como eres y sé que estás orgullosa de mí.

A Beauty, gracias hermanita por creer en mí hasta en lo imposible.

A Omar por escucharme, apoyarme y levantarme el ánimo cuando lo necesité.

INDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Indice	v
Indice de cuadros	viii
Indice de figuras	ix
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
II.1. ANATOMIA DEL SISTEMA NERVIOSO	5
II.1.1 Sistema Nervioso Periférico	5
II.1.2 Sistema Nervioso Central	8
II.2. SISTEMA NEUROENDOCRINO	8
II.2.1 Hipotálamo	8
II.2.2 Hipotálamo y alimentación	11
II.2.3 Hipotálamo y metabolismo	12
II.2.4 Glándula Pituitaria	13
II.2.5 Hormonas pituitarias	13
II.2.6 Inervación de la hipófisis	15
II.2.7 Regulación de las respuestas hormonales.....	16
II.2.8 Neurosecreción.....	16
II.3. GALANINA COMO PEPTIDO (GALP)	19
II.3.1 Diferencia entre galanina y Galanina como Péptido (GALP)	20
II.3.2 Expresión del GALP en el cerebro.....	21
II.3.3 Expresión del GALP en la pituitaria posterior.....	22
II.3.4 Regulación del RNAm del GALP en el cerebro.....	22
II.3.5 Efecto del GALP en la ingestión, peso corporal y metabolismo.....	23
II.3.6 El GALP y su relación molecular con el metabolismo y reproducción.	24

	Página
III. HIPOTESIS	25
IV. OBJETIVO GENERAL	26
V. OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
VI. METODOLOGÍA	27
VI.1. Prueba Piloto.....	27
VI.1.1 Preparación de los animales.....	27
VI.1.2 Procedimiento quirúrgico.....	28
VI.1.3 Test de cánula o inyección Intra Cerebro Ventricular (i.c.v.).....	29
VI.1.4 Cálculo de los factores de las Cámaras Metabólicas.....	30
VI.1.5 Inyección del GALP ó Fluido Cerebroespinal Artificial (aCSF).....	31
VI.1.6 Análisis de datos.....	32
VI.2. Experimento.....	33
VI.2.1 Preparación de los animales.....	34
VI.2.2 Procedimiento de calibración de los transmisores de temperatura y actividad.....	34
VI.2.3 Procedimiento quirúrgico.....	35
VI.2.4 Test de cánula mediante la prueba con Angiotensina II.....	35
VI.2.5 Inyección del GALP ó Fluido Cerebroespinal Artificial (aCSF).....	36
VI.2.6 Análisis de datos.....	37
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
VII.1. Prueba piloto.....	39
VII.1.1 Peso corporal.....	39
VII.1.2 Ingestión dietética.....	40
VII.1.3 Temperatura corporal.....	41
VII.1.4 Tasa metabólica (consumo de Oxígeno)	42
VII.2. Experimento.....	45

	Página
VII.2.1 Peso corporal.....	45
VII.2.2 Ingestión dietética.....	46
VII.2.3 Temperatura corporal.....	48
VII.2.4 Tasa metabólica (consumo de Oxígeno).....	49
VII.2.5 Nivel de actividad motora.....	52
VIII. CONCLUSIONES.....	53
IX. CONCLUSIÓN GENERAL.....	54
X. LITERATURA CITADA.....	55
XI. APENDICE.....	66

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Efectos de la i.c.v. del GALP en el peso corporal.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución del Arc del GALP en el cerebro de la rata.....	4
2. Organización del Sistema Nervioso.....	6
3. Localización del Hipotálamo.....	9
4. Hipotálamo e Hipófisis.....	13
5. Axis hipotálamo-pituitario.....	14
6. Ejemplo de Neuropéptido (Oxitocina).....	18
7. Secuenciación genética del GALP.....	21
8. Equipo “stereotax”.....	28
9. Implantación de cánula.....	29
10. Imagen de una cánula i.c.v. implantada.....	29
11. Rata dentro de la cámara metabólica.....	32
12. Vista del implante de transmisor de temperatura.....	35
13. Porcentaje de pérdida de peso 24 horas post inyección.....	39
14. Promedio de ingestión (g/kg de peso corporal) de 3 a 6.5 horas post inyección.....	40
15. Temperatura corporal post inyección (1.5 y 8. horas).....	41
16. Evolución del Consumo de Oxígeno en el periodo comprendido entre los primeros 90 minutos del experimento.....	43
17. Evolución del Consumo de Oxígeno en el periodo comprendido entre los minutos 390 y 480 del experimento.....	44
18. Porcentaje de pérdida de peso 24 horas post inyección.....	45
19. Ingestión Dietética 0-8 horas post inyección.....	46
20. Ingestión Dietética 8-24 horas post inyección.....	47
21. Temperatura corporal 0-24 horas post inyección.....	49
22. Tasa metabólica 0-4 horas post inyección.....	50
23. Tasa metabólica 4-8 horas post inyección.....	51
24. Tasa metabólica completa de 0-8 horas post inyección.....	51
25. Nivel de actividad 0-24 horas post inyección.....	52

I INTRODUCCIÓN

Actualmente, el mundo está enfrentando un nuevo problema: el aumento en la incidencia de ciertos desórdenes metabólicos tales como la obesidad y Diabetes Mellitus por un lado y por el otro Anorexia y Bulimia Nervosa. Los primeros se relacionan con un aumento en la ingestión y en los segundos se observa una privación de la ingestión como es el caso de la Anorexia Nervosa y una combinación exceso-privación (atracón-purgación) como se observa en la Bulimia Nervosa.

Es de suma importancia mencionar que la obesidad tanto en adultos como en niños ha ido en aumento. Hay sólidas pruebas de que la obesidad hoy en día es uno de los riesgos más importantes para la salud mundial. La epidemia de obesidad está bien documentada en los países desarrollados y a pesar de que hay menos información procedente de los países en vías de desarrollo, los datos que están apareciendo indican un patrón similar de creciente prevalencia de obesidad en un periodo de tiempo relativamente corto¹.

Lo más impresionante es que lo que anteriormente se consideraba como un problema de adultos, es actualmente un problema serio en niños; según datos de la Organización Mundial de la Salud¹, la obesidad en niños para el 2010 se duplicará, dicha cifra podría ser mayor según la Asociación Internacional para el Estudio de la Obesidad si la gente no comienza a realizar cambios no sólo en la alimentación sino en el estilo de vida. Recientes publicaciones muestran que para el término de esta década 38% de los niños en Europa presentarán sobrepeso y un 50% de los niños del Continente Americano presentarán sobrepeso, lo cual indica que en un futuro estos niños podrían presentar serios problemas de obesidad^{2,3}.

Como resultado a este aumento en la obesidad y sobrepeso se ha observado un aumento en la Diabetes tipo 2, esto también a nivel mundial; en su informe sobre la Salud Mundial de 2002, la OMS calculó que la obesidad y la inactividad física son responsables al menos de dos tercios de los casos de diabetes tipo 2. El número de personas con diabetes en el mundo se está acercando rápidamente a los 200 millones y una gran mayoría tiene Diabetes tipo 2^{1,4}.

Aunado a lo anterior, también se ha observado un aumento en los Trastornos de la conducta alimentaria tales como Anorexia y Bulimia Nervosa, aproximadamente en los Estados Unidos se calcula que cerca de 10 millones de Norteamericanos padecen hoy en día de desórdenes alimentarios ¹(90 % mujeres y 10 % son hombres). Como ya se mencionó con anterioridad, el problema es a nivel mundial ya que en México algunos datos estadísticos muestran que de un 3 a 5% de las mujeres jóvenes, entre los 12 y los 25 años de edad, padecen algún tipo de trastorno y entre el 50 y el 70 % de las personas con sobrepeso son comedores compulsivos; con base en las estadísticas referentes a los Trastornos de la conducta alimentaria, es importante mencionar que debido a la dificultad de su diagnóstico, es bastante difícil establecer datos de prevalencia^{5,6}.

Con el aumento en estos desórdenes metabólicos se ha llegado a pensar que probablemente el problema no sea tan simple como parece; tal vez no se trata sólo de dejar o comenzar a comer, tal vez el problema incluya otro tipo de reguladores y no sólo la voluntad de las personas. Con el fin de entender a mayor profundidad estos problemas metabólicos se han comenzado a realizar diversas investigaciones las cuáles involucran el estudio de los neuropéptidos, los cuáles según recientes investigaciones desempeñan una multiplicidad de papeles, actuando como hormonas locales o transmisores en el tracto gastrointestinal y como transmisores globales en el cerebro.

Dichas investigaciones sugieren que algunos neuropéptidos controlan la ingestión, saciedad, tasa metabólica entre otros, dentro del grupo de neuropéptidos que controlan la ingesta se encuentra el neuropéptido GALP (Galanin Like Peptide) ó Péptido semejante a la Galanina, su efecto se ha relacionado con la ingestión, tasa metabólica y temperatura corporal, por lo cual actualmente se cree que este neuropéptido podría tener alguna relación con la obesidad, Diabetes Mellitus y Trastornos alimentarios, su estudio y por ende su entendimiento podría dar nuevas pautas en lo referente a la etiología de los desórdenes metabólicos previamente mencionados ^{7,8,9}.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Actualmente tanto en México como en otras partes del mundo, se han incrementado ciertos desórdenes metabólicos los cuales conducen a las siguientes consecuencias:

- Ingestión dietética alterada, como es el caso de la Anorexia y de la Bulimia Nerviosa.
- Pérdida de la función reproductiva.
- Tasa metabólica y señales metabólicas alteradas (resistencia a la insulina, disminución de los niveles de leptina) lo cual conlleva a patologías como Diabetes Mellitus y obesidad ^{7,8,9}.

En lo referente a la obesidad y Diabetes Mellitus (DM), es de suma importancia señalar que en México, en los últimos 12 años, la DM aumentó en un 5.9%; en el 2000 y 2001 esta patología ya fue la primer causa de muerte en mujeres (14%) y la segunda en hombres (11%) ^{2,3}.

La obesidad también ha ido en aumento, en su informe mundial la Organización Mundial de la Salud (OMS) afirmó que 1,200 millones de personas en todo el mundo tienen problemas de sobrepeso y obesidad, cifra que equivale, aproximadamente, al mismo número de sujetos con desnutrición ¹.

Aunado a lo anterior conviene mencionar que en las últimas dos décadas, la obesidad se incrementó en más de un 30% en México, porcentaje ligeramente mayor al que se presenta en los EUA, por ello se ha concluido que la obesidad contribuye a un número cercano de 200 000 muertes por año en México ⁴.

El lado opuesto a los anteriores desórdenes metabólicos corresponde a la Anorexia y Bulimia Nerviosa, las estadísticas indican que en México de 3 a 5% de las mujeres jóvenes, entre los 12 y los 25 años de edad, las padecen y nueve de cada diez casos se refiere a mujeres jóvenes (12 a 25 años de edad) ⁵.

Estas patologías (Anorexia y Bulimia Nerviosa) dañan al uno por ciento de la población mundial. La fundación Internacional CBA (Contra la Bulimia y la Anorexia) reporta que 81% de

las mexicanas quieren bajar de peso, 40.9% emplea algún método restrictivo, 27% consume pastillas para disminuir su peso, 7% se induce el vómito para reducir su peso y 12% se administra laxantes y diuréticos.

Con el fin de entender éstos y otros desórdenes metabólicos se han realizado diversos estudios e investigaciones, incluyendo el estudio de un nuevo neuropéptido denominado Péptido semejante a la Galanina o GALP (por sus siglas en inglés Galanin Like Peptide) descubierto en 1999 ^{10, 11,12}, el cual ha demostrado tener cierta relación con la ingestión dietética, el metabolismo, la obesidad y la diabetes ^{12, 13,14}. Particularmente en el caso de la obesidad, recientes investigaciones en ratas obesas han revelado una disminución en la expresión genética del GALP, por lo que, el estudio de este neuropéptido resulta de interés para conocer con certeza el papel que el GALP juega en torno a la ingesta y metabolismo ^{15,16}.

Recientemente, el GALP se ha sido descrito como un potente mediador tanto del metabolismo como de la reproducción. El GALP y el RNAm del GALP se expresan en una pequeña población de neuronas en el Hipotálamo, específicamente en el núcleo Arcuato (Arc) actuando en el Sistema Nervioso Central (SNC), dicha característica es única de este neuropéptido ^{15,16}. (Figura No 1). El Arc juega una función central en una gran variedad de procesos homeostáticos y es particularmente importante en la regulación de la ingestión dietética, gasto energético y regulación del peso corporal ^{17,18}.

La importancia del GALP en el campo nutricional, es que su expresión genética solamente es influenciada por ciertos estados metabólicos, lo cual significa que el GALP responde a la insulina, leptina y sustratos metabólicos, como la glucosa y ácidos grasos ^{19, 20,21}. La expresión

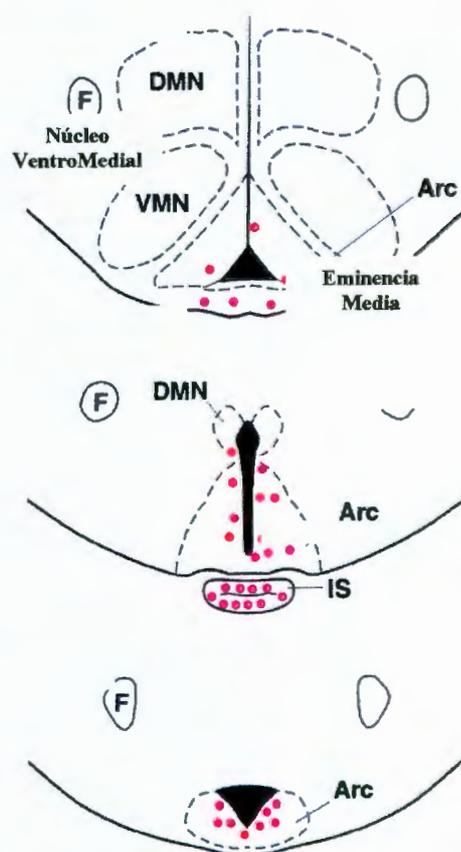


Figura No 1 Distribución del Arc del GALP en el cerebro de la rata

genética del GALP se ve severamente reducida durante estados metabólicos negativos tales como el ayuno y la diabetes ^{17, 18}.

Como ya se mencionó anteriormente, las investigaciones sugieren que la activación del sistema simpático podría estar mediada por el Péptido semejante a la Galanina, lo cual significa que existe una estrecha relación entre el Sistema Nervioso y el neuropéptido denominado GALP ^{17, 18,19}.

II.1. ANATOMÍA DEL SISTEMA NERVIOSO

El Sistema Nervioso humano, es sin duda alguna, el dispositivo más complejo ideado por la naturaleza. No solo controla todos los procesos que ocurren en el cuerpo humano recibiendo información de las diferentes partes del mismo y enviando instrucciones para un correcto funcionamiento, sino que también permite la interacción con el medio ambiente, recibiendo, procesando y almacenando los estímulos recibidos por los órganos de los sentidos. Finalmente, el sistema nervioso, y en particular el cerebro, constituye una central de inteligencia responsable del aprendizaje, memoria, raciocinio entre otras funciones, las cuáles son realizadas por un conjunto de órganos denominados neuronas ²².

El Sistema Nervioso se puede dividir en dos grandes ramas, el Sistema Nervioso Periférico y varias subdivisiones y el Sistema Nervioso Central ²² (Figura No 2)

II.1.1 Sistema Nervioso Periférico

El Sistema Nervioso Periférico (SNP) se puede dividir en sistema aferente y en sistema eferente. El sistema aferente (*ad*=hacia; *fer*=llevar) consiste de células nerviosas que se encargan de llevar la información de los receptores en la periferia del cuerpo hacia el Sistema Nervioso Central. Estas células nerviosas, denominadas neuronas aferentes (sensoriales) son las primeras que recogen la información que llega. El sistema eferente (*efer*=llevar hacia fuera) consiste de

células nerviosas que llevan información del Sistema Nervioso Central hacia los músculos y las glándulas. Estas células nerviosas se denominan neuronas eferentes (motoras).

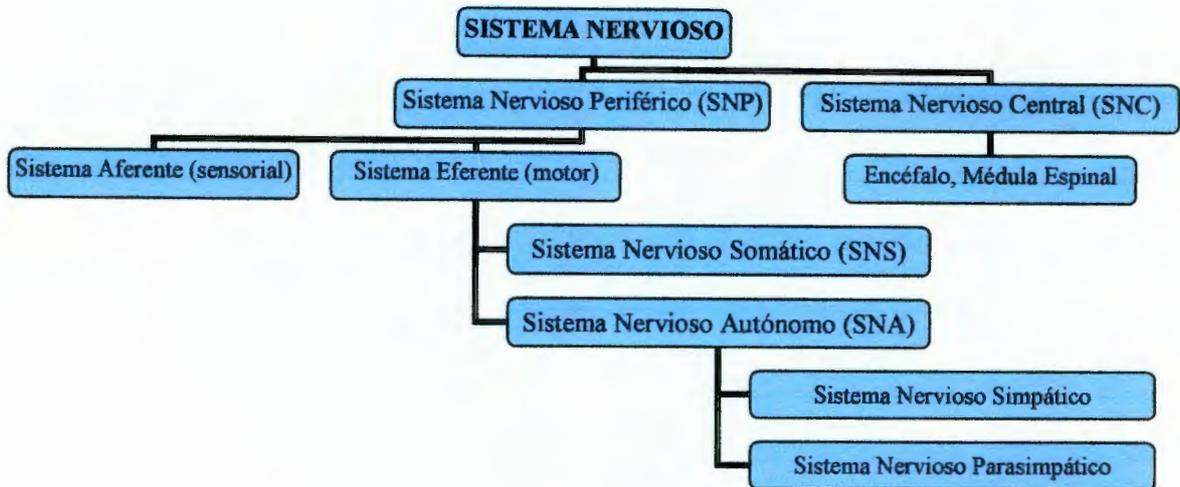


Figura No 2 Organización del Sistema Nervioso

El sistema eferente se subdivide en Sistema Nervioso Somático y en Sistema Nervioso Autónomo o Autónomo. El Sistema Nervioso Somático (*soma*=cuerpo) o SNS, consiste en neuronas eferentes que conducen impulsos del Sistema Nervioso Central hacia el tejido muscular esquelético. Se encuentra bajo el control consciente; y, por lo tanto, voluntario^{22,23,24}.

En resumen el Sistema Nervioso Somático está compuesto por:

- Nervios espinales, que son los que envían información sensorial (tacto, dolor) del tronco y las extremidades hacia el sistema nervioso central a través de la médula espinal. También envían información de la posición y el estado de la musculatura y las articulaciones del tronco y las extremidades a través de la médula espinal. Reciben órdenes motoras desde la médula espinal para el control de la musculatura esquelética.
- Nervios craneales, que envían información sensorial procedente del cuello y la cabeza hacia el sistema nervioso central. Reciben órdenes motoras para el control de la musculatura esquelética del cuello y la cabeza^{22,23,24}.

El Sistema Nervioso Autónomo (auto=por sí mismo; nomos=ley) o SNA también conocido como vegetativo, en contraste, contiene neuronas eferentes que conducen impulsos del Sistema Nervioso Central hacia el tejido muscular liso, el cardíaco y las glándulas. Puesto que produce respuestas a los músculos involuntarios y en las glándulas, por lo general se considera involuntario. El Sistema Nervioso Autónomo, se activa principalmente por centros nerviosos situados en la médula espinal, tallo cerebral e hipotálamo. También, algunas porciones de la corteza cerebral como la corteza límbica, pueden transmitir impulsos a los centros inferiores y así, influir en el control autónomo ²².

Los nervios autónomos están formados por todas las fibras eferentes que abandonan el sistema nervioso central, excepto aquellas que inervan el músculo esquelético. Existen fibras autonómicas aferentes, que transmiten información desde la periferia al sistema nervioso central, encargándose de transmitir la sensación visceral y la regulación de reflejos vasomotores y respiratorios, por ejemplo los barorreceptores y quimiorreceptores del seno carotídeo y arco aórtico los cuáles son de suma importancia en el control del ritmo cardíaco, presión sanguínea y movimientos respiratorios. Estas fibras aferentes son transportadas al sistema nervioso central por nervios autonómicos principales como el neumogástrico, nervios espláncnicos o nervios pélvicos.

Aunado a lo anterior el Sistema Nervioso Autónomo funciona a través de reflejos viscerales, es decir, las señales sensoriales que entran en los ganglios autónomos, la médula espinal, el tallo cerebral o el hipotálamo pueden originar respuestas reflejas adecuadas que son devueltas a los órganos para controlar su actividad. Reflejos simples terminan en los órganos correspondientes, mientras que reflejos más complejos son controlados por centros autonómicos superiores en el sistema nervioso central, principalmente el hipotálamo.

El Sistema Nervioso Autónomo se divide funcionalmente en:

- Sistema simpático: usa noradrenalina como neurotransmisor, y lo constituye una cadena de ganglios. Está implicado en actividades que requieren gasto de energía.
- Sistema parasimpático: Lo forman los ganglios aislados y usa la acetilcolina, se encarga de almacenar y conservar la energía.

En general, las fibras de una división estimulan o aumentan la actividad del órgano, en tanto que las fibras de otra inhiben o disminuyen dicha actividad^{22,23,25}.

II.1.2 Sistema Nervioso Central

El Sistema Nervioso Central es una estructura extraordinariamente compleja que recoge millones de estímulos por segundo que procesa y memoriza continuamente, adaptando las respuestas del cuerpo a las condiciones internas o externas. En él residen todas las funciones superiores del ser humano, tanto las cognitivas como las emocionales. El Sistema Nervioso Central consta de encéfalo y médula espinal.

El encéfalo es la porción del Sistema Nervioso que se encuentra encerrado en la cavidad craneal y continúa con la médula espinal a través del agujero occipital, el encéfalo se divide en tres grandes regiones:

- Prosencéfalo (diencéfalo y hemisferios cerebrales); el diencéfalo origina el tálamo y el hipotálamo
- Meséncéfalo
- Rombencéfalo (bulbo raquídeo, protuberancia y cerebelo).

Por otra parte conviene mencionar que el término tronco, o tallo del encéfalo, se refiere a todas las estructuras que hay entre el cerebro y la médula espinal, esto es, el mesencéfalo o cerebro medio, el puente o protuberancia y el bulbo raquídeo o médula oblongada^{22,23,24,25}.

II.2. SISTEMA NEUROENDOCRINO

II.2.1 Hipotálamo

El hipotálamo es una glándula que forma parte del diencéfalo y está situado debajo del tálamo en la línea media en la base del cerebro. Está conformado por distintas regiones y núcleos hipotalámicos encargados de la regulación de impulsos fundamentales y de las condiciones del

estado interno del organismo (homeostasis, nivel de nutrientes, temperatura, entre otros) ^{22, 26,27}(Figura No 3)

El hipotálamo es el centro nervioso controlador de todas las secreciones endocrinas, segregando neuro-hormonas que son conducidas a la hipófisis, la cual recibe información por vía nerviosa, ya sea del medio interno ó externo, a través de los receptores, el hipotálamo regula, entre otras funciones, la temperatura, actividad sexual y conducta alimentaria, a través de los núcleos ventromedial y paraventricular, donde se localiza el centro de la saciedad, y por el núcleo lateral, responsable del inicio de la ingestión ^{26,27}.

Como ya se mencionó anteriormente, el hipotálamo actúa también como enlace entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino. En efecto, tanto el núcleo supraóptico como el

núcleo paraventricular y eminencia media están constituidos por células neurosecretoras que producen hormonas que son transportadas hasta la neurohipófisis a lo largo de los axones del eje hipotálamo-hipofisiario. Allí se acumulan para ser excretadas en la sangre o para estimular células endocrinas en la hipófisis ²⁷.

Con base en todo lo anteriormente mencionado se puede resumir que el hipotálamo y la hipófisis tienen íntimas relaciones anatómicas y funcionales, a su vez, estas estructuras regulan el funcionamiento de diversas glándulas endócrinas, como la tiroides, las suprarrenales y las gónadas; por ende tiene un papel importante en la regulación del crecimiento, el metabolismo, la lactancia y el equilibrio hídrico ^{28,29}.

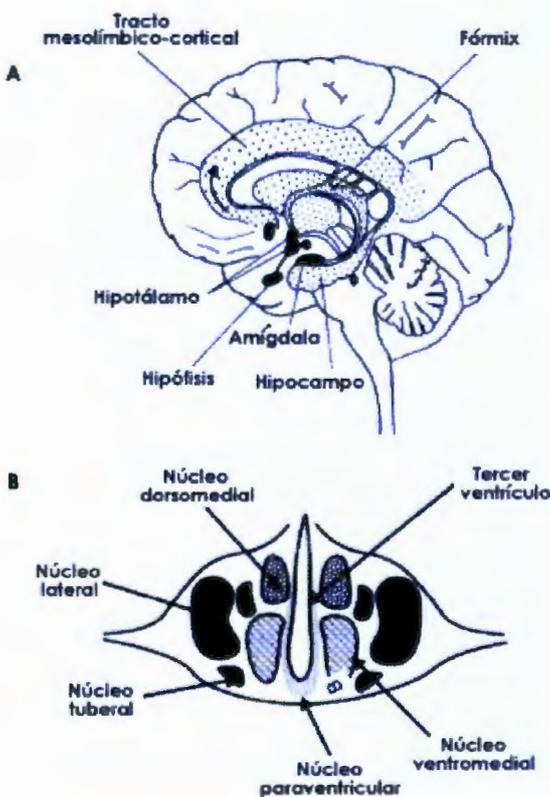


Figura No 3 Localización del Hipotálamo

Conviene señalar, que el eje hipotálamo-hipofisiario juega un papel central en el sistema endocrino, ya que organiza las respuestas hormonales apropiadas a estímulos provenientes de

centros neurológicos superiores. Desde el punto de vista fisiológico el hipotálamo tiene parte del control de la secreción de hormonas de la adenohipófisis y es el responsable de la producción de hormonas neurohipofisarias como oxitocina y vasopresina. A su vez la neurohipófisis y el hipotálamo son controlados por las hormonas de los órganos blanco; por ejemplo el cortisol inhibe la secreción de la Hormona Adrenocorticotropa (ACTH) de origen adenohipofisiario y de la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH) de origen hipotalámico^{29,30,31}.

A continuación se mencionan las áreas hipotalámicas particularmente importantes para la regulación de los centros neuroendocrinos (Figura No 3):

- Núcleo arcuato: Se localiza exactamente en la parte superior de la eminencia media y regula una gran variedad de funciones neuroendocrinas. Este núcleo comprende ciertas regiones del cerebro fuera de la barrera hematoencefálica.
- Núcleo Ventromedial (VMN): se localiza en la zona dorsal del Núcleo Arcuado. Realiza conexiones extrahipotalámicas y regula la ingestión y comportamiento sexual.
- Núcleo paraventricular (PVN) y núcleo supraóptico (SO): Sintetizan y secretan las hormonas de la pituitaria posterior. El núcleo supraóptico, tal como su nombre lo indica se sitúa en la región dorsolateral de la parte caudal del quiasma óptico y en el segmento inicial del tracto óptico. El núcleo paraventricular se localiza en la parte hipotalámica anterior y región dorsal del núcleo ventromedial.
- Núcleo periventricular (PeN): Las células neurosecretoras de este núcleo participan en la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento de la pituitaria anterior.
- Area medial preóptica (mPOA): Esta área juega un rol importante en el control del comportamiento sexual y en la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior.
- Núcleo supraquiasmático (SCN): Es un pequeño núcleo situado en la parte alta del quiasma óptico. Este núcleo juega un importante papel en la coordinación y regulación de los ritmos circadianos^{29,31,32}.

II.2.2 Hipotálamo y alimentación

La regulación de la alimentación implica la imbricación de múltiples sistemas de control cerebral, así como su interrelación con factores sociales como son la educación y las costumbres.

En la regulación de la ingestión de alimentos existen tres grandes grupos de factores relevantes que pueden condicionar trastornos de la conducta alimentaria, el primer factor corresponde a las vías neuronales efectoras del SNC, es decir, las neuronas implicadas en la transmisión del Neuropeptido Y, neuronas neuropeptídicas, opioides, galanina y el Péptido semejante a la Galanina o GALP, siendo éste el sistema que determinaría la cuantía, frecuencia y tipo de ingestión ^{28, 34, 35,36}.

El segundo factor corresponde a la regulación de la ingestión a corto plazo, lo cual incluye las propiedades sensoriales de los alimentos y en general las señales procedentes del eje neurocéntrico y de la distensión del tracto gastrointestinal ^{28, 31,32}.

El tercer factor incluye las señales neuronales responsables del control de la ingestión a largo plazo, que informan al SNC de las variaciones de la cantidad de masa grasa del organismo. En este sistema los protagonistas son la insulina y la leptina ²⁸.

El hipotálamo actúa manteniendo la homeostasis nutricional del organismo, activando o suprimiendo la ingestión a través de una compleja red de neurotransmisores, estímulos neurogénicos, estímulos externos psicológicos, ambientales de olfato, gusto y vista. Se ha comprobado que la administración de agonistas serotoninérgicos, por su acción sobre los núcleos ventromedial y paraventricular, produce Anorexia. Por su parte, la administración de antagonistas serotoninérgicos produce aumento de la ingestión porque se anulan las sensaciones de saciedad ^{28,32,33,37}.

II.2.3 Hipotálamo y metabolismo

Como se mencionó anteriormente el hipotálamo está considerado como un importante centro regulador de muchas funciones vegetativas, por lo cual podría decirse que el hipotálamo es un importante regulador del metabolismo, lo cual incluye el control de las siguientes funciones biológicas:

- Regulación del equilibrio hídrico: el núcleo supraóptico y el paraventricular, en conexión con el lóbulo posterior de la hipófisis, serían responsables de la producción de la hormona antidiurética, que regula la eliminación de orina.
- Regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, de las grasas y de las proteínas: provoca la sensación de hambre. La lesión de ciertas partes del hipotálamo conduce a la pérdida completa del apetito, mientras que la lesión de otras zonas acentúa la sensación de hambre.
- Regulación de la temperatura: una lesión hipotalámica puede producir la imposibilidad de difundir el calor, un exceso de sudoración o hiperpnea (respiración frecuente) y, por lo tanto, excesiva difusión del calor;
- Regulación del sueño: cuando falta el control hipotalámico, aparece un estado de gran apatía y somnolencia o insomnio.
- Regulación hormonal: controla la producción de hormonas por parte del lóbulo anterior de la hipófisis, influyendo en el crecimiento corporal, en las funciones sexuales, entre otras^{26, 35, 60,66}.

Aunado a lo anterior, el hipotálamo desempeña un papel importante en algunas funciones psíquicas y psicomotoras: ciertos estados de hiperexcitabilidad o de depresión se deberían a trastornos funcionales de los centros hipotalámicos, y también dependerían de estos mismos centros los efectos colaterales, representados por palpitaciones, lagrimeo, salivación, vómito, rubor, etc., que acompañan a los estados emotivos^{25,35}.

II.2.4 Glándula pituitaria o hipófisis

La glándula pituitaria o hipófisis se localiza en la base del cerebro específicamente en la región conocida como “silla turca” en el esfenoides. Es un pequeño órgano que pesa poco más de medio gramo, por encima de la pituitaria se encuentra el hipotálamo y entre la pituitaria y el hipotálamo se localiza la eminencia media³², aunado a lo anterior, la glándula pituitaria se encuentra suspendida del hipotálamo mediante el eje denominado eje hipotálamo-hipófisis (Figura No 4). La proximidad entre estos dos órganos refleja la relación funcional entre ellos, ya que la pituitaria opera como traductor para el cerebro, realizando esto a través del Hipotálamo, el cual controla una infinidad de funciones^{28, 32, 35}.

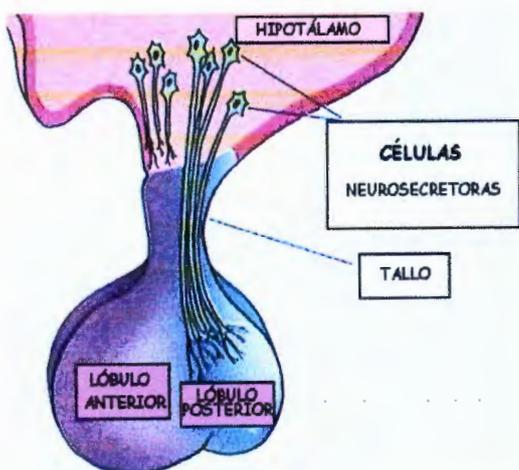


Figura No 4 Hipotálamo e Hipófisis

La hipófisis tiene dos porciones, la adenohipófisis o hipófisis anterior y la neurohipófisis, también conocida como hipófisis posterior. Como sus nombres indican, estas dos partes son estructural y funcionalmente diferentes. La adenohipófisis es una glándula con un epitelio marrón-rojizo, ocupa alrededor del 80% de la glándula pituitaria y está compuesta por tres porciones: la parte distal, la parte intermedia y la parte tuberal, la adenohipófisis no recibe inervación directa del hipotálamo. La neurohipófisis es una

estructura nerviosa firme de color gris compuesta por axones y su estroma de sostén proviene del hipotálamo, por lo cual a diferencia de la adenohipófisis, esta sí recibe inervación directa del hipotálamo^{22, 32, 35, 36}.

II.2.5 Hormonas pituitarias

Durante las primeras décadas del siglo XX, Harvey Cushing definió un número importante de funciones llevadas a cabo por la glándula pituitaria, entre las cuales destacan: crecimiento, regulación del metabolismo, reproducción, lactancia, presión arterial, retención de

líquidos y contracción uterina (Figura No 5). La glándula pituitaria secreta ocho hormonas, su función se resume a continuación:

- Gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH): actúan en las gónadas para regular la reproducción y estimular la secreción sexual esteroidea. La LH y FSH participan en el desarrollo folicular del ovario, ovulación y cuerpo lúteo, esto en la mujer; en el hombre ambas hormonas trabajan juntas para promover la producción de espermatozoides.
- Prolactina: estimula el desarrollo de las mamas y producción de leche, a pesar de que la prolactina se secreta en el hombre su función no ha sido identificada.
- Hormona de crecimiento (GH): actúa en varios sitios del cuerpo y regula el crecimiento y metabolismo. La GH también estimula la liberación de la Insulina como Factor de Crecimiento 1 (IGF-1) la cual actúa como mediador en diversas funciones de la GH.
- Hormona estimulante del Tiroides (TSH): participa en la regulación del metabolismo actuando en la glándula tiroidea mediante el control de las hormonas tiroideas.
- Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH): actúa en la corteza adrenal y regula la síntesis y liberación de corticoesteroides, también actúa directamente en el hígado y tejido adiposo regulando el metabolismo de los ácidos grasos.
- Vasopresina (VP): también conocida como hormona antidiurética (ADH), actúa regulando el volumen sanguíneo, actuando en el túbulo distal del riñón y controlando la reabsorción de líquidos.
- Oxitocina: lleva a cabo dos funciones primordiales en el caso de la mujer.

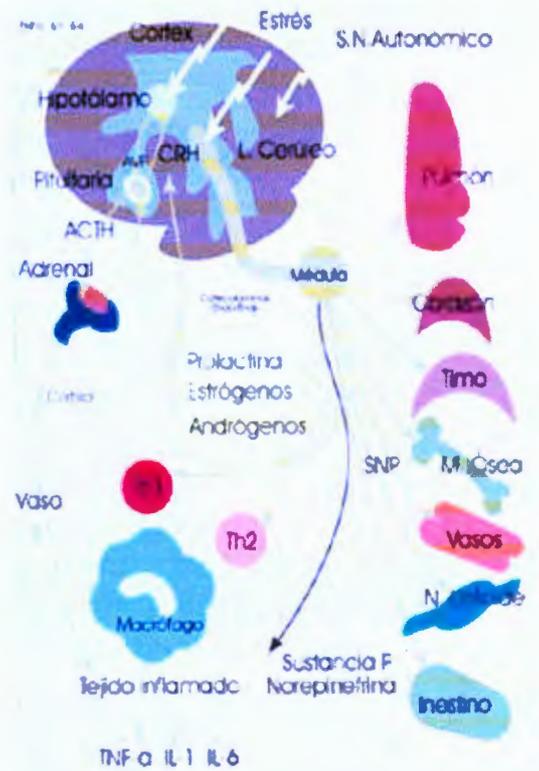


Figura No 5 Axis hipotálamo-pituitario

Primero actúa en el útero mediante la estimulación de contracciones durante el parto. Segundo, actúa en la glándula mamaria para permitir la secreción de leche, al igual que en el caso de la prolactina, la función de la oxitocina en el hombre es desconocida ^{38, 39, 40,41}.

II.2.6 Inervación de la hipófisis

La inervación de la glándula pituitaria es excepcional y crucial en la regulación de sus funciones. A pesar de este hecho, la adenohipófisis no tiene inervación directa, aparte de pequeñas fibras simpáticas asociadas a los capilares que llegan a ella. Por más que las conexiones neurales puedan afectar el flujo de sangre que se dirige a la adenohipófisis, aparentemente no tienen un rol directo en la regulación de la secreción hormonal llamada adenohipofisaria.

El lóbulo posterior, requiere de conexiones neurales (axones y fibras nerviosas que nacen del hipotálamo) para la secreción normal de las dos hormonas producidas en el lóbulo posterior las cuáles son la oxitocina y la vasopresina, como también para el transporte de varios péptidos hipotalámicos que regulan las funciones de la adenohipófisis.

Efectos directos del hipotálamo sobre la glándula pituitaria han sido mejor estudiados mediante el trasplante de fragmentos pituitarios dentro del hipotálamo mismo. Sin embargo, considerando las bases hipotalámicas del control neural del lóbulo anterior, uno podría hablar de la eminencia media como una "glándula", en la cual están localizadas terminaciones nerviosas que secretan hormonas hipofisiotrópicas relacionadas con el plexo primario y un área mas extensa en el hipotálamo basal, lugar donde las sustancias hipofisiotrópicas son encontradas, las cuales corresponden a los axones y cuerpos celulares del tracto túbero-hipofisario.

Actualmente se ha demostrado que el área hipofisiotrópica y la eminencia media pueden sintetizar hormona liberadora de tiotropina (TRH) y hormona liberadora de luteína (LRH) a partir de un precursor aminoacídico a través de un mecanismo no ribosomal ^{22, 23, 24, 25,28}.

II.2.7 Regulación de las respuestas hormonales

Una vez que la hormona ha obtenido la reacción deseada por medio de su receptor y respectiva vía, la señal estimuladora debe ser disminuida para que la sobreactivación no ocurra, esto se logra por mecanismos celulares amortiguadores y un juego complicado de circuitos informativos positivos y negativos (Figura No 5). Los circuitos informativos son el principal mecanismo para el control, en general, los circuitos informativos operan de la manera siguiente: el hipotálamo libera su hormona estimuladora pituitaria (usualmente de forma pulsátil), causando que la hipófisis libere su hormona en el flujo sanguíneo, lo cual une su respectivo receptor a la superficie de las células del tejido diana. En respuesta, el tejido diana actúa produciendo un efecto biológico y una o varias hormonas de respuesta. Estas hormonas terciarias son liberadas por el tejido diana a la corriente sanguínea, las cuales interactúan con receptores específicos del tejido hipotalámico e hipofisario, dicha interacción actúa para terminar la producción y/o liberación de la hormona pituitaria o hipotalámica inicial ^{22, 42, 43,44}.

Es importante mencionar que estos pasos son bastante dependientes de la concentración, de esta manera, a medida que las concentraciones aumentan o disminuyen, ciertos procesos son iniciados o terminados para mantener un firme estado de interacciones y concentraciones hormonales. Tomados juntos, la liberación pulsátil de las hormonas hipotalámicas y el control impuesto, resultan en pautas cíclicas de la concentración hormonal en la corriente sanguínea ^{28, 30,40}.

II.2.8 Neurosecreción

El concepto de que las neuronas sintetizan hormonas y las secretan a la circulación, fue inicialmente propuesto por Ernest Scharrer en 1928, inicialmente esta idea fue descartada por diversos investigadores, sin embargo este concepto ha sido aceptado recientemente ⁴⁵.

Se define a la neurosecreción como la capacidad específica de segregar un producto de síntesis neuronal al medio extracelular, con la propiedad de generar un efecto fisiológico en un efector u órgano diana.

Una neurona neurosecretora es básicamente igual a cualquier otra neurona, excepto que su axón termina en conjunción con una ventana capilar en vez de hacer una conexión sináptica con otra neurona. Las hormonas que las neuronas neurosecretoras sintetizan, son usualmente péptidos que pueden actuar como neurotransmisores en algún lugar del sistema nervioso, pero una vez que son producidos estos neurotransmisores son liberados en la circulación y viajan para actuar sobre un blanco distante. Las neuronas neurosecretoras varían de tamaño y de forma. Existen desde tipos macrocelulares que se encuentran en el área supraóptica y núcleo paraventricular hasta células muy pequeñas que se encuentra en el hipotálamo ^{45,46}.

Se conoce como neurotransmisor al grupo de sustancias químicas cuya descarga, a partir de vesículas existentes en la neurona pre-sináptica, hacia la brecha sináptica, produce un cambio en el potencial de acción de la neurona post-sináptica (en otras palabras, el neurotransmisor es el que permite el paso del impulso nervioso a través de la sinapsis); son numerosos los ya descubiertos y de naturaleza química muy distinta entre unos y otros, los primeros conocidos fueron la adrenalina y la acetilcolina ⁴⁶.

Los neuromoduladores son sustancias peptídicas que se originan fuera de la sinapsis y que modifican la excitabilidad neuronal, siendo algunos de ellos los neuropeptidos, la sustancia P, y las prostaglandinas. Los neuromoduladores son sustancias secretadas de manera natural que actúan de manera similar a un neurotransmisor, con la diferencia de que no se quedan restringidos en el espacio sináptico sino que se difunde por el fluido extracelular.

Los neurotransmisores y neuromoduladores actúan como transmisores o propagadores de mensajes específicos o primeros mensajeros, que al activar al sistema transductor de la adenilato ciclasa membranal, activan el sistema amplificador que transforma al ATP o GTP en AMPc o GMPc o segundo mensajero, que al activar diversos componentes enzimáticos, dan origen a la respuesta celular.

Para que la neurosecreción prosiga se requiere de los neuromediadores, los cuáles son transmisores químicos que aumentan las respuestas post sinápticas y se les ha denominado

segundos mensajeros. El neuromediador no es lo mismo que un neuromodulador ya que el segundo mensajero es habitualmente el AMPc ^{45,46}.

Los eventos químicos asociados con la neurotransmisión son:

- Síntesis del neurotransmisor, donde a veces participan las neuroglías.
- Almacenamiento de moléculas de neurotransmisor en vesículas sinápticas.
- Liberación de transmisores por exocitosis, lo cual es Ca^{+2} -dependiente. A la neurona presináptica llega un impulso nervioso y abre los canales de Ca^{+2} . El Ca^{+2} entra y el neurotransmisor es vertido en el espacio sináptico.
- Unión del neurotransmisor al neuroreceptor. Esto es la activación del receptor de la membrana plasmática de la neurona postsináptica.
- Iniciación de las acciones del segundo mensajero. El receptor de la neurona postsináptica envía unas respuestas intracelulares que pueden desencadenar diferentes respuestas.
- Inactivación del transmisor, ya sea por degradación química o por readsorción en las membranas. El neurotransmisor tiene que desaparecer por: la presencia de un enzima específica que inactive el neurotransmisor o a través de la recaptación, proceso mediante el que la célula presináptica vuelve a coger el neurotransmisor y lo guarda en su interior (implica un ahorro).

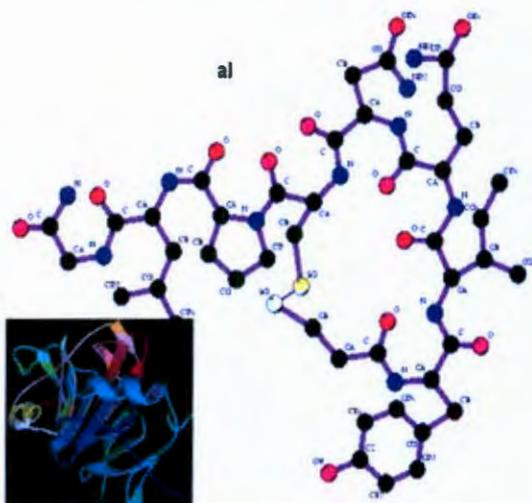


Figura No 6 Ejemplo de Neuropéptido (Oxitocina)

Un neuropéptido es una cadena de dos o más aminoácidos unidos por puentes peptídicos que se diferencian de otras proteínas sólo por la longitud de la cadena de aminoácidos (Figura No 6). Se han secuenciado alrededor de 100 neuropéptidos de fuentes biológicas, su tamaño puede variar desde dos aminoácidos (ej: carnosina) hasta más de 40 aminoácidos (CRH). Aunado a lo anterior, los neuropéptidos son péptidos complejos que actúan como comensajeros, coliberando su acción con el neurotransmisor y a la vez modulando su acción; es

decir que por un lado actúan como neurohormonas (TRH, CRF, LHRH, PRL), y por el otro como moduladores de neurotransmisores. Se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso a partir de una molécula precursora, la proopiomelanocortina, y luego en el complejo de Golgi, en forma de encefalinas, endorfinas, ACTH y MSH. Los neuropéptidos se clasifican en opioides y no opioides^{17, 18, 19}.

Los neuropéptidos opioides se denominan así por su acción similar al opio o a sus derivados como la morfina, algunos de ellos son las encefalinas, las endorfinas y las dinorfinas^{17, 18}.

Los no opioides son la sustancia P, la colecistoquinina, el polipéptido intestinal vasoactivo, el Neuropéptido Y y el Péptido semejante a la Galanina o GALP¹⁷.

II.3. GALANINA COMO PEPTIDO (GALP)

El neuropéptido denominado Péptido semejante a la Galanina o GALP es un neuropéptido el cual se expresa en el núcleo arcuato (Arc); las neuronas contenidas en el GALP son blanco para la acción de la leptina, dichas neuronas se encuentran situadas muy cerca de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), esto en el área preóptica. Las inyecciones del GALP en el Sistema Nervioso Central (SNC) estimulan la GnRH modelando la secreción de la hormona luteinizante. Dichas observaciones indican que el GALP es una señal molecular que acopla el metabolismo al sistema neuroendocrino y reproductivo regulando con esto la actividad reproductiva como función del estado metabólico⁴⁷.

El cerebro presenta una habilidad para percibir el estado de las reservas energéticas y ajustar éstas al apetito y metabolismo, esto con el fin de mantener un peso corporal adecuado. Además, el cerebro gobierna la actividad del sistema reproductivo como función de las reservas metabólicas y permite la activación del eje gonadal hipotalámico-glandula pituitaria; esta integración fisiológica es realizada por el Arc en el hipotálamo^{48, 49, 50, 51}.

Recientemente el GALP demostró modular tanto el metabolismo como el comportamiento reproductivo, lo cual muestra cierta relación entre metabolismo y reproducción. Es por ello que se ha concluido que el Arc integra el metabolismo y reproducción ⁴⁸.

El Arc comprende el circuito neuroendocrino requerido para la integración metabolismo-reproducción ⁴⁸. Dos poblaciones de neuronas del Arc juegan papeles primordiales en la regulación fisiológica de los procesos metabólicos, mientras una población produce Neuropéptido Y (NPY) y el Péptido Agouti-Related (AgRP), la otra genera la hormona estimulante de melanocitos tipo α (α -MSH) y β -endorfina a partir de dos precursores; la proopiomelanocortina (POMC) y la cocaína-anfetamina transcripta regulada (CART). Estos dos grupos de células (NPY-AgRP y POMC/CART) son regulados por hormonas metabólicas como la leptina e insulina y actúan controlando el apetito, peso y tasa metabólica ^{52, 53,54}.

Las neuronas del NPY-AgRP y POMC/CART mandan proyecciones axonales al núcleo paraventricular (PVN) ⁵⁴, hipotálamo lateral y algunas otra porciones en el cerebro, con el fin de regular el circuito que controla los comportamientos complejos como la ingestión y el ajuste de la tasa metabólica, esto con el único fin de mantener el peso corporal y con ello mantener la homeostasis ^{53, 54,55}.

II.3.1 Diferencia entre galanina y Galanina como Péptido (GALP)

La galanina fue descubierta en 1983 ⁵⁶, este neuropéptido está compuesto de 29-30 aminoácidos (dependiendo de las diversas especies de seres vivos), su actividad y diferenciación biológica se debe a su porción N-terminal correspondiente a los aminoácidos 1-13 ⁵⁷. La galanina se encuentra ampliamente distribuida en el cerebro (incluyendo el Arc), medula espinal e intestinos ⁵⁸ y se correlaciona con otros neuropéptidos, tal es el caso de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH.), hormona liberadora de crecimiento (GHRH), vasopresina y neurotransmisores clásicos como la noradrenalina ^{59,60,61}. La galanina se encuentra implicada en muchos procesos fisiológicos incluyendo la ingesta, nocio percepción, memoria y funciones neuroendocrinas ^{61, 62, 63,64}.

Es importante mencionar que la galanina tiene 3 subtipos de receptores, GALR1, GALR2 y GALR3, los cuales comparten cierta secuencia idéntica aunque difieren en la distribución y en la proteína G-acopladora, anteriormente la galanina era el único miembro conocido de la familia de los neuropéptidos ^{64, 65, 66}.

Por otra parte, el GALP fue descubierto por error en 1999 en Japón cuando se buscaban moléculas de unión y activación de la galanina, las cuales se conocen como receptores de la galanina, el GALP comparte cierta secuencia con la galanina y en *Vitro* se une a los receptores GALR1 y GALR2 ^{67, 68}. A pesar de que la galanina y el GALP comparten cierta secuencia, estos dos presentan una codificación genética diferente; para empezar, el GALP esta compuesto de 60 aminoácidos, sin embargo los aminoácidos 9-21 del GALP son idénticos a la porción N-terminal (1-13) de la galanina, sólo que a diferencia de la galanina el GALP posee una porción N-terminal no aminada (Figura No 7) ^{69, 70, 71}.

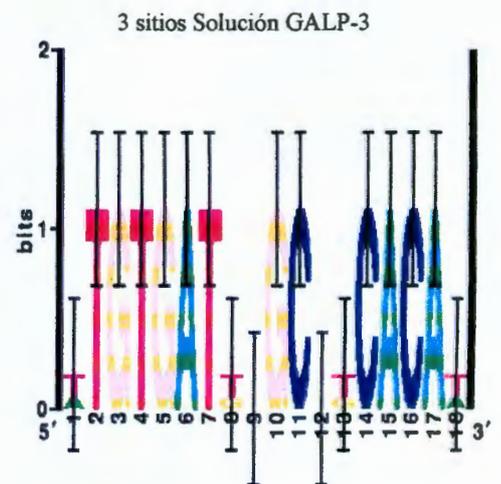


Figura No 7 Secuenciación genética del GALP

II.3.2 Expresión del GALP en el cerebro

El GALP se localiza únicamente en el cerebro, y su secuencia genética ha sido parcialmente identificada en los ratones, ratas y humanos ^{72, 73}. Las células en el Arc y eminencia media tanto de las ratas, ratones y changos expresan el RNAm del GALP. En el Arc, las neuronas que contienen GALP son diferentes al resto de las poblaciones de células liberadoras de péptidos y no se encuentran en el mismo lugar de NPY, galanina, somatostatina o GHRH ^{74, 75, 76}; sin embargo una pequeña población de neuronas (<10%) de GALP expresan α -MSH. La distribución anatómica de las células que contienen el RNAm del GALP en el Arc difiere entre las especies ^{77, 78}. En Arc de los ratones, las células del GALP se localizan en una región de forma más lateral y ventral que en las ratas ⁷⁴.

II.3.3 Expresión del GALP en la pituitaria posterior

En el caso específico de la rata, el GALP se expresa en la pituitaria posterior, mejor conocida como neurohipofisis ^{77,78}. El descubrimiento del GALP en la neurohipofisis y su aparente ausencia en la pituitaria anterior es algo sorprendente, esto debido a que en el caso de la galanina, los receptores GALR1 y GALR2 se expresan en la pituitaria anterior y no en la neurohipofisis ⁷⁰. La expresión del RNAm del GALP en la neurohipófisis de la rata se induce cuando hay una ingesta excesiva de sal o cuando hay privación de agua, lo cual podría indicar que el GALP juega un papel en la liberación de la vasopresina y balance hídrico. Aunado a lo anterior, la expresión del RNAm del GALP se induce durante la lactancia, lo que indica que el GALP regula la secreción de la oxitocina al igual que la vasopresina. Notablemente, ni la lactancia ni el exceso de sal (privación de agua) alteran la expresión del RNAm del GALP en el Arc, solamente en la neurohipófisis ^{70, 72,75}.

II.3.4 Regulación del RNAm del GALP en el cerebro

Las hormonas metabólicas y sustratos energéticos regulan la expresión del GALP en el cerebro. El ayuno reduce la expresión del RNAm del GALP en el Arc y el tratamiento de leptina durante el ayuno revierte este efecto ^{71,72,79}. La deficiencia de leptina en ratones obesos reduce significativamente los niveles del RNAm del GALP en el hipotálamo ^{72, 80}. Como ya se mencionó con anterioridad, el tratamiento intracerebroventricular (icv) con leptina restaura completamente los niveles de expresión del RNAm del GALP. Las ratas y ratones con receptores de leptina disfuncionales (*fa/fa* y *db/db* respectivamente) ^{73, 77,78}, también presentan una expresión reducida del RNAm del GALP. Estas observaciones indican que la expresión del RNAm del GALP presenta relación con la leptina ⁷⁷.

Por otro lado, la insulina también regula la expresión del RNAm del GALP, estudios realizados con ratas inducidas a la Diabetes presentan una fuerte disminución del RNAm del GALP en el Arc, lo cual se corrige con tratamiento de insulina ^{47, 81,82}. Aunado a lo anterior la administración directa de insulina al cerebro durante el ayuno estimula la expresión de RNAm del GALP, lo cual indica que también la insulina actúa directamente en el cerebro en la inducción

del RNAm del GALP, por todos los estudios anteriores se ha demostrado que las hormonas metabólicas y sustratos energéticos regulan la expresión genética del GALP^{81,82}.

Las hormonas tiroideas también presentan influencia en la expresión del RNAm del GALP⁸³, diversos estudios han demostrado que concentraciones menores de las hormonas tiroideas disminuyen los niveles hipotalámicos del RNAm del GALP y el reemplazo con tiroxina en las ratas revierte este efecto^{81, 84,85}. Aunado a lo anterior, la liberación del GALP de forma directa en el cerebro, reduce la secreción de la Hormona estimulante de la Tiroides, lo cual nuevamente indica que el GALP juega un rol importante en la regulación del eje hipotálamo-hipofisiaria^{86,87}. Es de suma importancia mencionar que la expresión del GALP no es influenciada por las concentraciones circulantes de los glucocorticoides, esteroides y hormona del crecimiento^{70,81}.

II.3.5 Efecto del GALP en la ingestión, peso corporal y metabolismo

La administración central del GALP tiene potentes efectos en la ingestión y peso corporal de los roedores; sin embargo, la naturaleza de estos efectos depende del tiempo y de las especies. En el caso de las ratas, durante las primeras 2 horas de administración, el GALP estimula la ingestión de forma similar a la galanina, esta observación ha sido confirmada por diversas investigaciones^{81, 82, 83,84} mediante la utilización de diversas fuentes de GALP. Sin embargo, estudios realizados por Lawrence et al. y Krasnow et al³⁰ documentaron que el GALP inhibe la ingestión y reduce el peso corporal en ratas a las 24 horas post-inyección. En conclusión estas observaciones demuestran, que en el caso específico de las ratas, la administración central del GALP presenta un efecto bifásico en la ingesta, es decir el GALP tiene un efecto inicial orexigénico seguido por un efecto anorexigénico mantenido durante las 24 horas post-inyección. El efecto global observado es ligeramente anorexigénico^{85,87}.

Por otro lado, el GALP en el ratón ejerce una supresión de la ingestión y una disminución del peso corporal, ambos efectos ocurren entre las 2 y 24 horas post-inyección⁸⁷, sin embargo una vez transcurridas 24 horas de haber administrado el GALP, este ya no ejerce efecto alguno, es importante recalcar que esta reacción ocurre únicamente en el caso de los ratones. Krasnow et

al. demostraron que el cambio en la ingestión debido a la administración central del GALP se acompaña de cambios significativos en la actividad motora, efecto que no ocurre en las ratas ³¹.

La administración del GALP en el cerebro de ratones *ob/ob* por 14 días condujo a una inhibición de la ingestión y también se observó una pérdida de peso corporal durante las primeras 24 horas post-inyección ^{88,89}, sin embargo es de suma importancia señalar que el cambio en la ingesta como respuesta al GALP es más rápida en los ratones *ob/ob* que en los de tipo salvaje ^{88,89}. Los animales leptino deficientes requieren de mayor tiempo (10 días) para que ocurra un cambio en la disminución de la ingestión. Por otra parte, el peso corporal de los ratones *ob/ob* no se recupera después del tratamiento con GALP, es decir, se mantiene aproximadamente un 12% por debajo con respecto al de los ratones tipo control, incluso a pesar de que la ingestión vuelve prácticamente a la normalidad. Esto indica que el GALP tiene efectos importantes en el metabolismo aunado a una regulación en el apetito e ingestión ⁹⁰.

El GALP podría también activar el Sistema Nervioso Simpático; el tratamiento crónico en ratones tipo *ob/ob* con GALP incrementa la temperatura corporal y estimula la activación de la acción simpática ^{84, 85, 86,90}. La reducción de peso corporal en animales con tratamiento crónico de GALP se atribuye a los efectos que el GALP causa en el Sistema Nervioso Simpático ^{87, 88, 89,90}.

II.3.6 El GALP y su relación molecular con el metabolismo y reproducción

Las neuronas GALP-positivas son candidatos atractivos para mediar los efectos del metabolismo, esto debido a dos razones: primero, las neuronas GALP-positivas son blancos directos para la regulación de ciertas hormonas metabólicas (leptina, insulina y hormona tiroidea), cuya señal es esencial para mantener la homeostasis del ser humano y segundo, el GALP por sí mismo puede estimular la secreción de la GnRH y también el comportamiento sexual ^{85, 86, 88, 89,90}.

III. HIPOTESIS

El Péptido semejante a la Galanina (GALP) incrementa la tasa metabólica sin producir un aumento en la actividad motora. El incremento en la tasa metabólica se reflejará en un aumento en el consumo de Oxígeno y temperatura corporal; lo cual producirá una disminución en el peso corporal de las ratas, a pesar de que se presente un aumento en la ingestión dietética.

IV. OBJETIVO GENERAL

Definir el efecto del GALP en la tasa metabólica, ingestión y temperatura corporal en ratas Sprague-Dawley, así como la respuesta que la administración del GALP produce en la actividad motora de los roedores.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar el efecto del GALP en la ingestión dietaria (g/kg de peso) en las ratas Sprague-Dawley a las 12 y 24 horas post inyección del GALP.
- Cuantificar el efecto del GALP en el peso corporal en las ratas tanto en gramos como en porcentaje de peso a las 24 horas post-inyección.
- Determinar si la diferencia de peso corporal del grupo control vs grupo experimental es significativa.
- Definir el efecto del GALP en la tasa metabólica, a través de la medición del consumo de Oxígeno (ml/min/Kg^{0.75}).
- Determinar si el cambio en la tasa metabólica produce algún cambio en la actividad física de las ratas.
- Definir el efecto del GALP en la temperatura corporal (°C) y su relación con la tasa metabólica.
- Correlacionar los cambios en la tasa metabólica y temperatura corporal con la actividad motora de las ratas.

VI. METODOLOGÍA

El experimento consiste en un estudio prospectivo doble cruzado (el grupo experimental se convierte posteriormente en grupo control y viceversa), compuesto por dos fases. La primera fase corresponde a la prueba piloto y la segunda comprende al experimento; la prueba piloto se llevó a cabo con el fin de analizar si la metodología planeada era la correcta, y en caso contrario realizar las modificaciones necesarias para llevar a cabo el experimento en sí. En el Apéndice No 1 y 2 se muestran dos diagramas de flujo que resumen la metodología tanto de la prueba piloto como del experimento.

VI.1. Prueba Piloto

VI.1.1 Preparación de los animales

Se pesaron y manipularon 20 ratas macho de 2 meses de edad tipo “Sprague-Dawley”, las cuáles fueron obtenidas de la empresa Harlan (Indianápolis, Indiana. EE.UU). La razón por la cuál se seleccionaron ratas machos se debe a que el manipuleo de los machos es mucho más sencillo que el de las hembras; y en lo correspondiente a la edad es aproximadamente a los 3 meses cuando se observa el cierre de la cavidad craneal.

Por dos semanas se llevó a cabo una manipulación previa de las ratas con el fin de acostumbrar a los animales al tacto humano y esperar a que su peso corporal alcanzara los 300g. Estas, se pesaban diariamente, con el fin de monitorear la evolución de su peso corporal.

Los roedores se mantuvieron en jaulas individuales en ciclos de luz/oscuridad de 12 hrs:12 hrs, las luces se encendían a las 07:00 hrs; se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fueron alimentados con dieta para roedores tipo estándar de laboratorios Harlan y la ingestión de alimentos y agua fue *ad libitum*.

La dieta estándar estaba compuesta de 14% peso de proteína, 3.5% peso de grasa y 5.5% peso de fibra, todo el alimento fue de origen vegetal, y contenía los siguientes nutrimentos: maíz,

gluten, carbonato de calcio, aceite de soya, fosfato dicálcico, sal iodada, L-lysina, DL-metionina, niacina, vitamina A, biotina, tiamina, suplemento de vitamina D3, ácido fólico, complejo de bisulfito de menadionina sódica (una fuente de vitamina K), suplemento de vitamina E, suplemento de vitamina B12, riboflavina, pantotenato de calcio, sulfato ferroso, oxido de magnesio, oxido manganeso, oxido de zinc, sulfato de cobre, iodato de calcio, carbonato de calcio, sulfato crómico de potasio.

VI.1.2 Procedimiento quirúrgico

Una vez que los animales se acostumbraron al tacto humano y alcanzaron el peso corporal de 300 g, se procedió con la cirugía (20 ratas) de implantación de cánulas, ya que la única forma de administración del GALP es a nivel cerebroventricular. Esto llevó a cabo mediante la siguiente secuencia:

- Las ratas fueron anestesiadas con un mezcla de ketamina (100 mg/ml de Ketamina, 2mg/ml de xylazina y 10 mg/ml de acepromazina) en una dosis de 1.1ml/kg de peso corporal, posteriormente se les inyectó ketofén como analgésico en una toma de 5 mg/kg de peso corporal.
- Como paso siguiente se prosiguió a realizar la cirugía en la cual se introdujo una cánula en el cerebro de los roedores utilizando un equipo de precisión denominado “stereotax”, el cual se puede apreciar en la Figura No 8. La cánula se colocó a nivel cerebro ventricular a 1.2 mm de la línea media, 1.2 mm de la parte posterior del bregma y a una profundidad de 32 mm bajo la duramadre (Figura No 9).
- Posterior a la cirugía, se les adicionaba a las ratas un antibiótico en polvo, esto con el fin de evitar cualquier tipo de infección. Se les permitió una semana de



Figura No 8. Equipo “stereotax”

recuperación, pero se continuó con un estricto monitoreo del peso, ya que una disminución brusca del mismo se asocia con la aparición de un proceso infeccioso.



Figura No 9. Implantación de cánula

VI.1.3 Test de cánula o inyección Intra Cerebro Ventricular (i.c.v.)

Transcurrida la semana de recuperación se probó el correcto funcionamiento de la cánula mediante una prueba de Inyección Intra Cerebro Ventricular (i.c.v.) la cual consistió en una inyección de 10 pmol de Angiotensina II en solución salina al 0.9% utilizando una jeringa tipo Hamilton de 3 μ l. En las ratas que bebieron dentro de un periodo de 5 minutos posteriores a la inyección, se consideró que la cirugía de implantación había sido exitosa y que estaban aptas para ser utilizadas en la experimentación. En la Figura No 10 se puede observar la imagen externa de una cánula correctamente implantada en uno de los roedores.

Una vez probado el correcto funcionamiento de las cánulas se procedió a realizar la experimentación en sí, mediante la selección de los animales (n=12) en grupos: control y experimental. Es importante mencionar que de las 20 ratas iniciales, 12 ratas mostraron un correcto funcionamiento de sus cánulas y el resto de las ratas fueron excluidas.

Como ya se mencionó previamente el experimento fue del tipo doble cruzado, (una rata sería inicialmente control y 2 semanas después sería experimental) por lo cual, al final fueron 12 control y 12 experimental.



Figura No 10. Imagen de una cánula i.c.v. implantada

A las 08:00 horas, se pesaban las ratas, este peso era considerado como el peso inicial (Pi). Posteriormente, se preparaban las cámaras metabólicas en las cuáles se introducirían las ratas; esta preparación fue mediante el cálculo de los factores de dichas cámaras metabólicas; el procedimiento utilizado se describe a continuación.

VI.1.4 Cálculo de los factores de las Cámaras Metabólicas

Debido a que el método más sencillo para medir el metabolismo basal mediante calorimetría indirecta, es a través de la medición del consumo de Oxígeno, fue que se decidió utilizar cámaras metabólicas en este trabajo experimental. La medición del consumo de oxígeno refleja la evolución de las reacciones metabólicas del cuerpo en las que se libera energía pues éstas dependen de un continuo suministro, y por lo tanto, un continuo consumo de oxígeno.

El procedimiento utilizado para el cálculo de los factores de las cámaras metabólicas fue el siguiente:

Inicialmente se midió la presión y la temperatura del cuarto, estos datos se utilizaron, para que con base en la tabla de correcciones para los barómetros de mercurio, se obtuviera el factor de corrección que permita conocer la presión absoluta del lugar donde se está realizando el experimento.

A continuación se ejemplifica el cálculo realizado para las cámaras utilizadas en el presente experimento:

Cámara Metabólica No 1:

Presión del cuarto = 751.8 mm de Hg.

Temperatura del cuarto = 22 °C.

Peso de la rata = 357.3 g.

Factor de corrección para barómetros de Hg = 2.69

$$RF1 = \left\{ \left[\frac{751.8 - 2.69}{760} \right] \cdot \left[\frac{273}{273 + 22} \right] \cdot \left(\frac{1405}{0.3573} \right) \right\} = 3,586.872$$

Donde:

760 mm de Hg es la presión atmosférica a condiciones estándar

273 °C es la temperatura a condiciones estándar

1405 es el factor de diseño de la Cámara Metabólica utilizada.

RF1 es el Factor Índice para la cámara número 1, dicho dato se introducirá al programa, de la cámara metabólica.

De manera similar se obtiene el factor para la Cámara Metabólica No 2, cuyo valor es de 1353:

Presión del cuarto = 751.8 mm de Hg.

Temperatura del cuarto = 22 °C.

Peso de la rata = 357.8 g.

Factor de corrección para barómetros de Hg = 2.69

$$RF2 = \left\{ \left[\frac{(751.8 - 2.69)}{760} \right] \cdot \left[\frac{273}{(273 + 22)} \right] \cdot (1353) / 0.3578 \right\} = 3,448.9558$$

VI.1.5 Inyección del GALP ó Fluido Cerebroespinal Artificial (aCSF)

Posterior al cálculo de los factores de las cámaras metabólicas y preparación de éstas; se inyectaron 3µl de GALP al grupo experimental y 3µl de fluido cerebroespinal artificial (aCSF) al grupo control, esto se realizaba a las 08:30 horas.

Una vez inyectadas las ratas (una rata control y una rata del grupo experimental), estas se colocaban sin alimento en las cámaras metabólicas, así como se puede ver en la Figura No 11, las cuales tenía 13.5 mm de ancho, 30.5 mm de largo y 21.5 mm de profundidad, por un período de 2 horas. El aire de la habitación se drenaba a través de las cámaras a 1.3 lt/min y el contenido de oxígeno se determinada usando un analizador de oxígeno con canales dobles tipo Amatex S-3A/II.

A las 1.5 horas post-inyección, se medía la temperatura rectal (TI), posteriormente a las 3 horas post inyección consumo de oxígeno se registraba en la computadora; una vez realizado este

registro las ratas regresaban a sus jaulas (no se medía el consumo de Oxígeno) donde se introducían 10 trozos de alimento estándar para rata y agua *ad libitum*, los trozos de alimentos se pesaban, para obtener los gramos de alimento inicial (Ii).

Transcurridas 6.5 horas de la inyección del GALP o aCSF (lo que equivale a 3.5 horas con alimento) se pesaba el alimento para obtener la ingestión final (If); y las ratas se colocaban nuevamente en las cámaras metabólicas sin alimento.

Las ratas permanecían en las cámaras metabólicas por 1.5 horas, es decir de 6.5 a 8 horas post inyección, a las 8 horas post inyección se volvía a medir la temperatura colónica (Tf) de los animales.



Figura No 11. Rata dentro de la cámara metabólica

Finalmente, las ratas se pesaban 24 horas después de haber sido inyectadas, para obtener el peso final (Pf).

VI.1.6 Análisis de datos

La ingestión dietética fue calculada como gramos consumidos/kg de peso corporal.

El peso ganado o perdido se obtuvo mediante la resta de peso inicial – peso final (Pi-Pf), así mismo se calculó el porcentaje de peso perdido.

Los datos de temperatura se analizaron realizando la resta de Temperatura inicial – Temperatura final.

El análisis del consumo de Oxígeno se expresó como ml de Oxígeno consumidos/minutos-kg de peso^{0.75}, dichos datos fueron analizados mediante la determinación del promedio del consumo de Oxígeno cada 30 minutos.

Los datos estadísticos se expresaron a partir del promedio \pm un error estándar. Se utilizaron dos tipos de análisis de varianza (ANOVA) como factores de medición repetidas y T de Student fue utilizada para el análisis estadístico, considerando significancia cuando $p < 0.05$.

VI.2. Experimento

VI.2.1 Preparación de los animales

Se pesaron y manipularon 30 ratas macho de un mes y medio de edad tipo Sprague-Dawley, las cuáles fueron obtenidas de la empresa Harlan (Indianápolis, Indiana. EE.UU). Por dos semanas se llevó a cabo una manipulación de las ratas con el fin de acostumbrar a los animales al tacto humano y esperar a que su peso corporal alcanzara los 300 g, Estas se pesaban todos los días, con el fin de monitorear su peso corporal.

Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales en ciclos de 12 hrs:12 hrs de luz/oscuridad, las luces se encendían a las 07:00 horas, se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, fueron alimentadas con dieta para roedores tipo estándar de laboratorios Harlan y la ingesta de alimentos y agua fue *ad libitum*.

Debido a que la toma de temperatura rectal resultó ser imprecisa y bastante incómoda para las ratas, se replanteó la forma de toma de temperatura, para lo cual se decidió que dicha toma se realizaría mediante transmisores de temperatura, los cuáles también miden la actividad motora, marca Mini Mitter tipo VM-FH, con series numéricas de B1439-B1453, dichos transmisores fueron preparados con tres capas de cera y fueron posteriormente calibrados, esto previo a las cirugías ya que dichos transmisores se implantarían en las ratas, (aspecto que se explica más adelante); el procedimiento de calibración de los trasmisores se explica a continuación.

VI.2.2 Procedimiento de calibración de los transmisores de temperatura y actividad.

En una tina de agua modelo YP121 marca Baxter se hirvió el agua a 36°C. Se introdujeron los transmisores, uno por uno, al agua hirviendo y el programa Vital View mostró la frecuencia del transmisor respectivo en Herz. Posteriormente se hirvió el agua a 41°C, nuevamente se introdujeron los transmisores, uno por uno, y de nueva cuenta se determinó la frecuencia de cada transmisor.

Los valores obtenidos en ambas temperaturas se compararon con aquellos de la tabla de calibración específica para este tipo de transmisores (marca Mini Mitter tipo VM-FH, con series numéricas de B1439-B1453), la cual presenta valores con una precisión de 0.052-0.051%. Si los valores obtenidos estaban dentro del rango de los presentados en la tabla, se consideró que los transmisores cumplían con la precisión requerida para el trabajo experimental.

VI.2.3 Procedimiento quirúrgico (Implantación de cánulas y transmisores de temperatura y actividad)

Una vez que los animales se acostumbraron al tacto humano y alcanzaron el peso corporal de 300 g, se procedió con la cirugía (30 ratas), esta vez se implantaron cánulas y transmisores de temperatura y actividad, los cuales como se comentó, fueron previamente calibrados. La secuencia fue la siguiente:

- Las ratas fueron anestesiadas con un mezcla de ketamina (100 mg/ml de Ketamina, 2mg/ml de xylazina y 10 mg/ml de acepromazina) en una dosis de 1.1 ml/kg de peso corporal, posteriormente se les inyectó ketofén como analgésico en una dosis de 5 mg/kg de peso corporal. Como paso siguiente, se prosiguió a realizar la cirugía de las ratas para introducir la cánula en el cerebro, exactamente en la misma posición que en el experimento anterior.
- Inmediatamente después del implante de cánula se procedió con los implantes de los trasmisores, esto a mediante una incisión de 2.5 cm a través de la parte baja de la pared abdominal izquierda (Figura No 12).

- Posterior a la cirugía, se les adicionaba a las ratas un antibiótico en polvo, con el fin de evitar cualquier tipo de infección; se les permitió una semana de recuperación, pero al igual que en el experimento anterior se llevó un estricto monitoreo del peso, por lo que los roedores se pesaban a diario.

VI.2.4 Test de cánula mediante la prueba con Angiotensina II

Para comprobar el correcto funcionamiento de las cánulas en el experimento número 2 se realizó una prueba con Angiotensina II, al igual que en la prueba piloto, se requiere de Angiotensina II, la diferencia es el tiempo y la precisión que esta prueba conlleva; el procedimiento utilizado en este test se describe a continuación:

- Se preparaba la inyección de 10 pmol de Angiotensina II en solución salina al 0.9%. Se procedía a llenar y pesar botellas de agua, con el fin conocer el peso de agua inicial. Dichas botellas se colocaban en las jaulas de experimentación, una vez que se les suministró (por la cánula) a las ratas la solución salina al 0.9 % de Angiotensina II. No se introdujo ningún



Figura No 12. Vista del implante de transmisor de temperatura

- tipo de alimento (sólo agua) a las jaulas de experimentación por un espacio de una hora, posteriormente se midió la ingesta de agua, mediante la diferencia de peso de las botellas.
- Las ratas que ingirieron 3 ml de agua/kg de peso igual o más, se consideró que sus cánulas funcionaban correctamente. En caso contrario, las ratas que no ingirieron una cantidad igual o mayor de 3 ml/kg de peso de agua, recibieron una segunda inyección de solución salina al 0.9 % de Angiotensina II, sólo que en esta ocasión se monitoreó su ingesta de agua a la hora y posteriormente a las dos horas de la inyección. Se consideró que la cánula estaba implantada correctamente, si las ratas ingerían una

cantidad de agua mayor a los 4 ml de agua/kg de peso, una vez que habían transcurrido las dos horas mencionadas.

En esta ocasión, de las 30 ratas que fueron sometidas a cirugía, 4 murieron y 16 ratas fueron consideradas con una cánula colocada correctamente (N=16).

VI.2.5 Inyección del GALP ó Fluido Cerebroespinal Artificial (aCSF)

Se seleccionaron las ratas (n=16) en grupos de control y experimental, es importante recalcar que el experimento fue nuevamente doble cruzado (la misma rata sería control y tres semanas después sería experimental), por lo que al final el control corresponde a 16 ratas y el grupo experimental corresponde a 16 ratas.

Al inicio del experimento las ratas se pesaban a las 08:00 horas; esto para obtener su peso inicial (Pi); posteriormente, se procedía a la preparación de las cámaras metabólicas, introduciendo los datos al analizador de oxígeno de la misma forma en que se realizó durante la prueba piloto.

Posteriormente se inyectaron 3µl de GALP, al grupo experimental y 3µl de fluido cerebroespinal artificial (aCSF) para el grupo control, esto se realizaba a las 08:30 horas.

Una vez inyectadas las ratas, cada una era colocada con 10 trozos de alimento estándar previamente pesados (peso del alimento inicial, Ii) y agua *ad libitum* en las cámaras metabólicas (13.5 mm de ancho, 30.5 mm de largo y 21.5 mm de profundidad). El aire de la habitación se drenaba a través de las cámaras a 1.3 l/min y el contenido de oxígeno se determinada usando un analizador de oxígeno con canales dobles tipo Amatex S-3A/II, los datos de consumo de Oxígeno eran introducidos a la computadora.

Transcurrida una hora de iniciado el experimento se pesaba el alimento y se calculaba la ingesta a 1 hora post-inyección (IPost1), esto se realizaba con el objetivo de evaluar el efecto del GALP una vez transcurrido este lapso de tiempo.

Posteriormente se volvían a introducir los trozos de comida (previamente pesados, IPost1) por 7 horas, transcurrido este lapso, se pesaba el alimento y se calculaba la ingestión total en 8 horas de post-inyección (IPost8), con esto se obtenía información de la ingestión de los animales a dos periodos: a 1 y a 8 horas de post-inyección.

En lo referente a las cámaras metabólicas; el analizador de Oxígeno se reiniciaba cada dos horas. La temperatura y la actividad motora de las ratas se monitoreaban constantemente, esto gracias a los transmisores de temperatura y actividad.

Al término de las ocho horas post-inyección, las ratas se transferían a una cámara más grande y permanecían allí hasta cumplir las 24 horas, esta transferencia era con el fin de monitorear temperatura y actividad motora, nuevamente se les introducía alimento (previamente pesado) y agua. Conviene mencionar que el modelo de esta nueva cámara es el S-3^a/11 y opera a una temperatura de 20.95°C.

A las 24 horas de post-inyección se pesaban las ratas y el alimento, con el fin de calcular la ingestión en el periodo de 8-24 horas y el peso transcurridas las 24 horas (Pf), así mismo se guardaban en la computadora los datos de temperatura y actividad motora para su posterior análisis.

VI.2.6 Análisis de datos

La ingestión dietética fue calculada como gramos consumidos/kg de peso corporal.

El peso ganado o perdido se obtuvo mediante la resta de peso inicial – peso final (Pi-Pf), también se calculó el porcentaje de peso perdido, lo cual se promedió posteriormente.

Los datos de temperatura se analizaron promediando los datos de temperatura de los transmisores los cuáles eran arrojados en intervalos de 5 minutos; cada 30 minutos la temperatura fue graficada y utilizada para el análisis estadístico.

El análisis del consumo de Oxígeno se expresó como ml de Oxígeno consumidos/minutos-kg de peso^{0.75}, donde los datos fueron analizados a través de la determinación del promedio del consumo de Oxígeno cada 30 minutos.

Los datos de actividad se promediaron en intervalos de 30 minutos, esto para graficar y llevar a cabo el análisis estadístico.

Los datos estadísticos se expresaron a partir del promedio \pm un error estándar. Se utilizaron dos tipos de análisis de varianza (ANOVA) como factores de medición repetidas y T de Student fue utilizada para el análisis estadístico, considerando significancia cuando $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1. Prueba piloto

VII.1.1 Peso corporal

En lo que respecta a la prueba piloto durante el periodo de 24 horas post inyección, el grupo control perdió un 1.1% del peso corporal, mientras que las ratas del grupo GALP perdieron un 4.2% del peso corporal inicial (Figura No 13), sin embargo el efecto de la inyección i.c.v. del GALP en cuanto a la diferencia del peso corporal perdido neto (gramos) no presentó diferencia estadística significativa ($p>0.05$), lo cual se puede observar en el cuadro No 1. Es importante recalcar que el GALP ejerce cierto efecto en la disminución del peso corporal en ratas, sin embargo el resultado no fue significativo (evaluando gramos netos); lo cual significa que se requiere más investigación para determinar con certeza el efecto del GALP en el peso corporal.

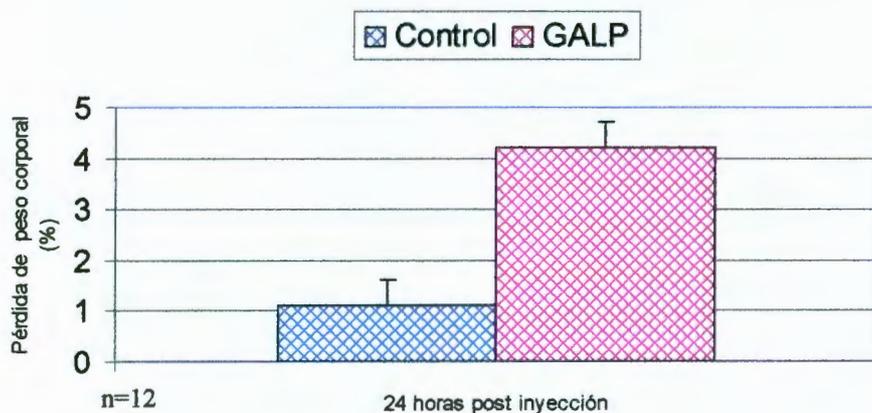


Figura No 13 Porcentaje de pérdida de peso 24 horas post inyección

	PESO CORPORAL	
	Inicial	Final
Control	345.7±4.8	341.8±4.3
GALP	356.2±4.6	341.4±5.1*

± un error estándar del promedio

* $p>0.05$

Cuadro No 1 Efectos de la i.c.v. del GALP en el peso corporal

VII.1.2 Ingestión dietética.

Como se mencionó en la metodología con anterioridad, se calcularon los promedios de ingestión de alimento (g ingeridos/kg de peso corporal) en las ratas a un tiempo de 3 y 6.5 horas post inyección. Los resultados muestran que las ratas inyectadas con GALP consumieron 0.263 g/kg de peso corporal más de alimento que los roedores del grupo control. Estos resultados concuerdan con los de Matsumoto et al⁸, quienes señalan que el efecto inicial del GALP (previo a las 24 horas), es ligeramente orexigénico y que una vez transcurridas 24 horas de su administración es cuando este neuropéptido ejerce un efecto anorexigénico.

Debido a que en este trabajo de investigación sólo se cuantificó la ingesta a las 3 y 6.5 horas post inyección, sólo se pudo apreciar el efecto del neuropéptido en este periodo, esto es, su comportamiento orexigénico, lo cual se puede apreciar en la Figura No 14 en donde se presentan los promedios de ingestión de los grupos mencionados. Es importante recordar que el experimento realizado es del tipo doble-cruzado, con lo cual se reduce de manera significativa el posible error experimental y por lo tanto incrementa la exactitud de los resultados alcanzados.

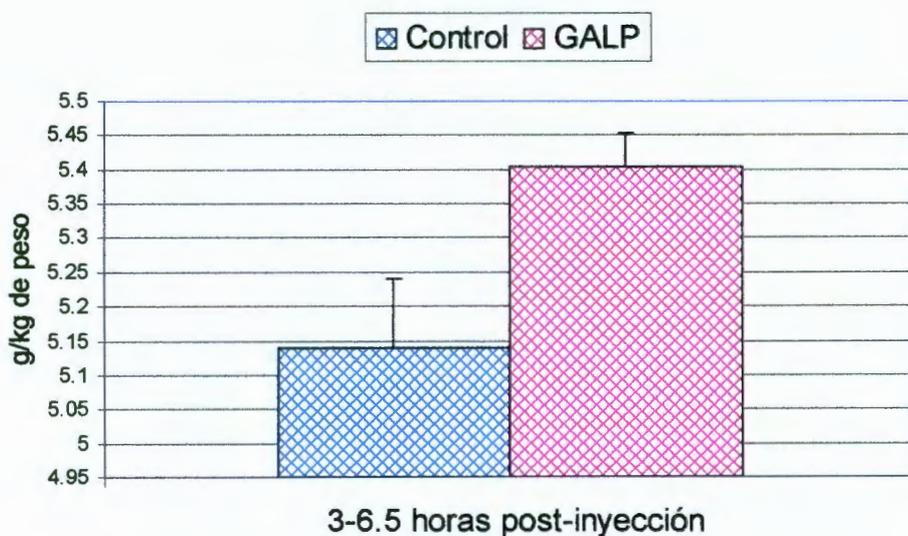


Figura No 14 Promedio de ingestión (g/kg de peso corporal) de 3 a 6.5 horas post inyección

VII.1.3 Temperatura corporal

En esta prueba piloto, como ya se mencionó en la metodología, la medición de la temperatura se llevó a cabo mediante termómetros colónicos, como se aprecia en la Figura No 15, los resultados no permitieron determinar el efecto del GALP en la temperatura corporal de los animales, esto se concluye en base a que no se aprecia ningún incremento, estadísticamente significativo ($p > 0.05$), en la temperatura corporal una vez transcurridas 1.5 y 8 horas post inyección. Las ratas del grupo GALP presentaron menor temperatura que el grupo control; estos resultados indican que no se encontró ninguna tendencia ya sea en el aumento o disminución de la temperatura posterior a la i.c.v.

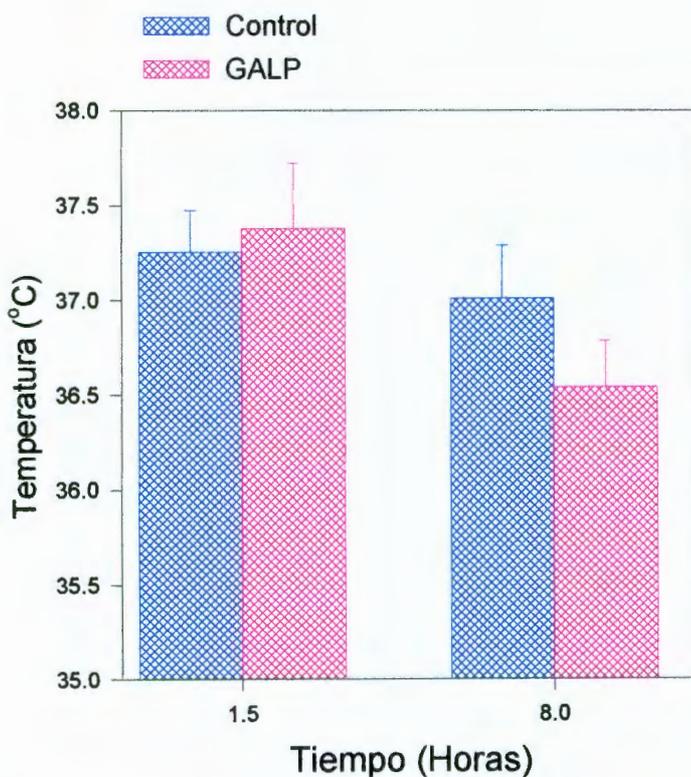


Figura No 15 Temperatura corporal post inyección (1.5 y 8. horas)

Tomando como base estos resultados se replanteó la metodología experimental, en cuanto a la toma de la temperatura corporal se refiere. El siguiente experimento (experimento en sí) se realizó utilizando transmisores de temperatura y de actividad, lo que de entrada, asegura lecturas

más cercanas a la realidad y además incrementa la certidumbre de los resultados obtenidos. Es importante mencionar que la toma de temperatura mediante termómetros colónicos irritaba a los roedores, generando una actividad espontánea, no medible y aleatoria del carácter de cada animal lo que probablemente conducía a un aumento en la temperatura.

VII.1.4 Tasa metabólica (consumo de Oxígeno)

Para realizar esta sección del experimento se utilizó el consumo de Oxígeno ($l/min/kg^{0.75}$) de los roedores como un dato para estimar la tasa metabólica de las ratas, lo cual está ampliamente aceptado en diversas publicaciones relacionadas con el tema.

La primera media hora arroja datos no concluyentes, esto debido a que es durante este tiempo cuando se metían las ratas (una rata control y otra experimental) a la cámara metabólica. Los animales no eran introducidos exactamente al mismo tiempo y por ello se considera la primera media hora como un periodo de “estabilidad en la medición”. Una vez transcurrido este tiempo, los resultados revelan que durante el periodo comprendido entre los minutos 30 y 80 no se observa algún efecto por parte del GALP en la tasa metabólica, sin embargo, como se puede ver en la Figura No 16, aproximadamente en el minuto 80 del experimento es cuando se aprecia un aumento en el consumo de oxígeno por parte de las ratas inyectadas con GALP, lo cual sugiere que el neuropéptido ejerce un efecto, incrementando la tasa metabólica de los animales.

Sin embargo, debido al protocolo experimental seguido en el presente trabajo, solo se tuvo oportunidad para monitorear 10 minutos de aumento de la tasa metabólica en esta etapa del experimento, los cuales no son suficientes para establecer de manera definitiva dicho efecto, es importante mencionar que el efecto del GALP sobre la tasa metabólica nunca se había estudiado hasta este momento, es por ello que hubo ciertos fallos metodológicos, mismos que fueron corregidos en el experimento posterior (denominado simplemente experimento).

Es importante recordar que entre los minutos 90-390 (1.5 - 6.5 horas post-inyección) del experimento, las ratas fueron trasladadas a sus jaulas con alimento por lo que no fue posible monitorear la evolución de su tasa metabólica durante este periodo.

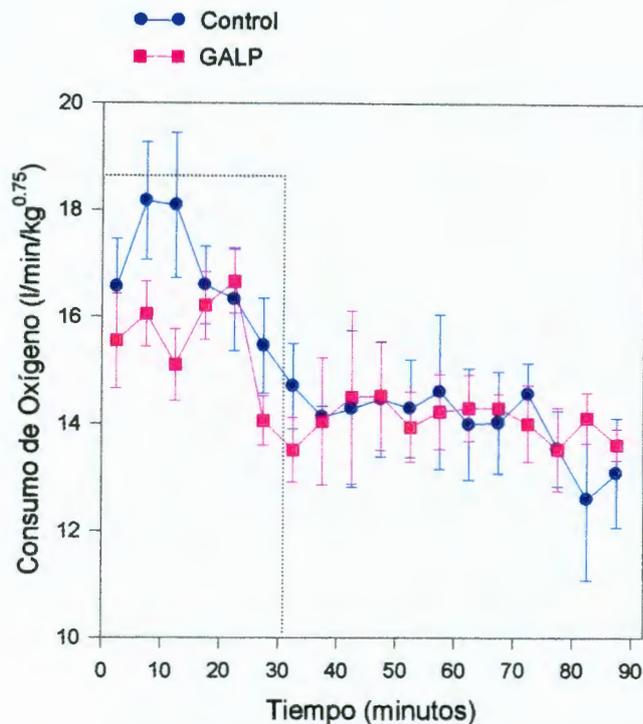


Figura No 16 Evolución del Consumo de Oxígeno en el periodo comprendido entre los primeros 90 minutos del experimento

Entre el minuto 390 y el 410 los animales fueron reintroducidos en las cámaras metabólicas y como en el caso anterior, se consideró un periodo de “estabilidad en la medición” por lo que fue a partir del minuto 410 que se consideró correcta la medición del consumo de Oxígeno y por lo tanto de la tasa metabólica. Como se puede apreciar en la Figura No 17, prácticamente durante toda la medición se observa un efecto de elevación de consumo de oxígeno como resultado de la administración del GALP, lo que revela el efecto del neuropeptido en la tasa metabólica de los animales. Es interesante observar las disminuciones cíclicas de la tasa metabólica cada 25 minutos (425, 450, 475), posterior a estos lapsos de 25 minutos se observa un despunte en el consumo de oxígeno de las ratas inyectadas con GALP.

Es interesante comparar la tendencia que el consumo de oxígeno presenta en ambos periodos de “estabilidad en la medición” presentados tanto en la Figura 16 como en la Figura 17, en los dos casos se observa un máximo del consumo de oxígeno seguido por una clara disminución del mismo, lo que sugiere una hiperactividad de los animales, propia del cambio de

ambiente. Al eliminar la información obtenida durante estos periodos se disminuye la posibilidad de que factores externos al efecto del GALP incidan en el resultado del siguiente experimento (experimento en sí).

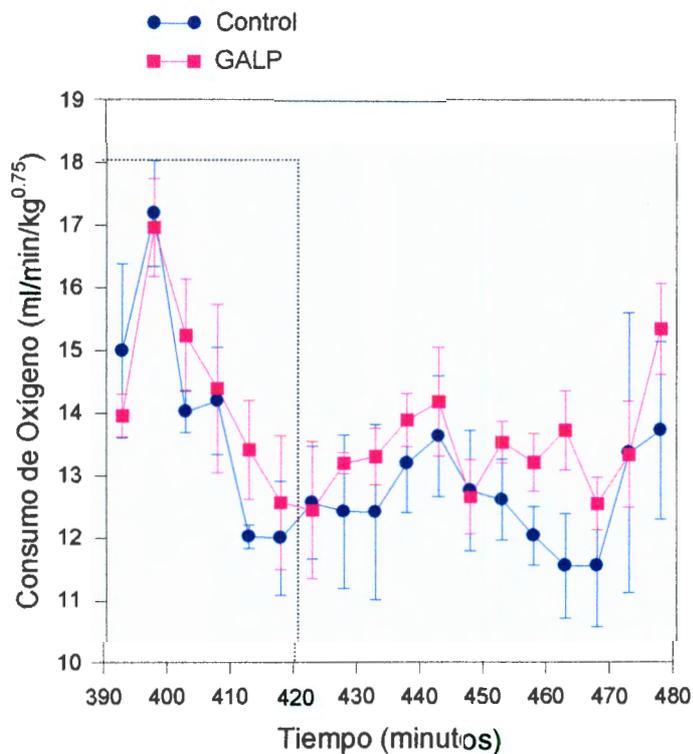


Figura No 17 Evolución del Consumo de Oxígeno en el periodo comprendido entre los minutos 390 y 480 del experimento

VII.2. Experimento

VII.2.1 Peso corporal

En lo referente al peso corporal, se observó, al igual que en la prueba piloto, una pérdida porcentual del peso en los animales. El grupo control presentó una pérdida del 0.98% mientras que el grupo GALP tuvo una disminución del 1.41% (Figura No 18). A pesar de que la pérdida de peso es menor en este segundo experimento que el observado en la prueba piloto, en ambas se puede constatar que hubo una disminución mayor en el grupo GALP que en el de control, lo que sugiere que existe un efecto del este neuropeptido en cuanto a la evolución del peso corporal, sin embargo, al igual que en el caso anterior, esta pérdida de peso no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$). Estos resultados nos invitan a concluir de forma preliminar que es necesaria una mayor investigación sobre el tema para determinar y cuantificar de manera confiable y estadísticamente significativa el efecto del GALP en el peso corporal

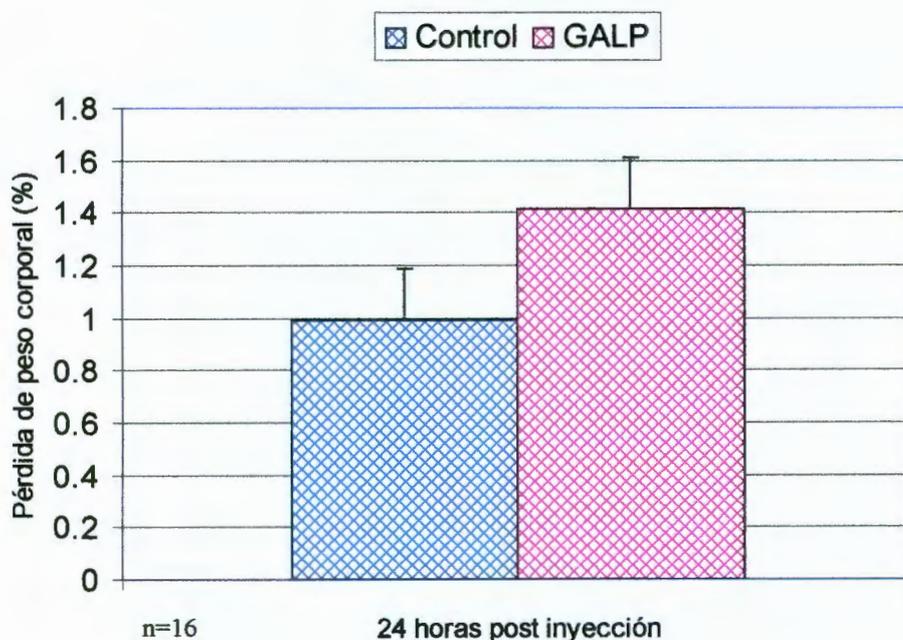


Figura No 18 Porcentaje de pérdida de peso 24 horas post inyección

VII.2.2 Ingestión dietética.

Durante la primera hora post inyección, las ratas, a las que se le suministró el GALP, consumieron lo doble del alimento que el grupo control, lo cual muestra el efecto orexigénico que el GALP ejerce durante la primer hora post inyección, sin embargo a las ocho horas de haber sido suministrado el neuropeptido ya se observa una disminución de dicho efecto. A pesar de que el consumo continúa siendo mayor en las ratas inyectadas con GALP, la diferencia en la ingestión ha disminuido notablemente, ya que, como se puede ver en la Figura 19, esta diferencia se redujo de ser de más del 100 % a solo un 20 % aproximadamente.

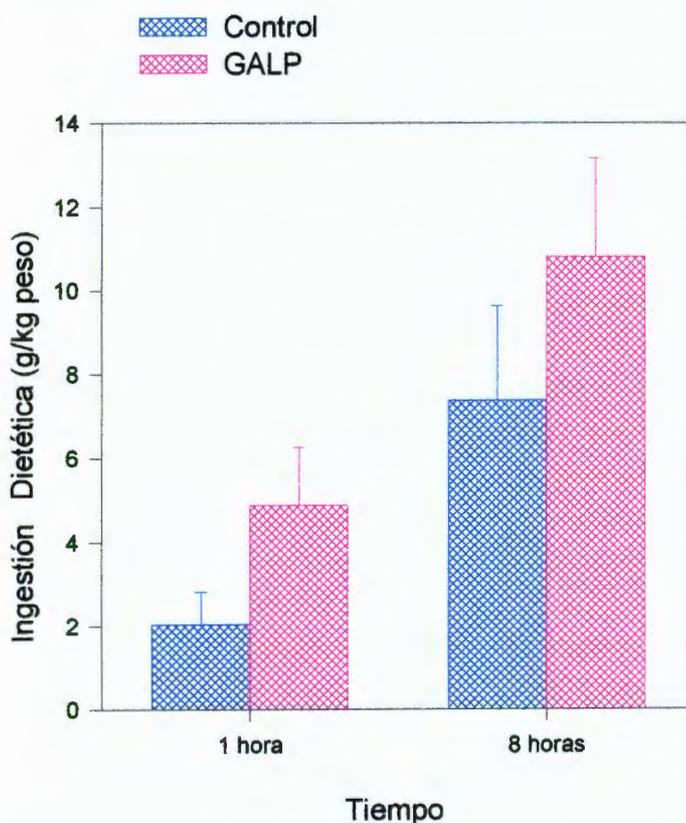


Figura No 19 Ingestión Dietética 0-8 horas post inyección

En contraste con la ingestión que se tuvo en el periodo 0-8 horas post inyección, la cantidad de alimento consumida en el periodo 8-24 horas es sensiblemente menor en las ratas del grupo GALP que en el control, así como se puede ver claramente en la Figura No 20, Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto orexigénico del GALP comienza a disminuir ya en las primeras 8 horas post inyección, y que en el periodo de 8-24 horas post inyección el efecto es anorexigénico, aspecto que concuerda con los resultados obtenidos por Matsumoto et al⁸, sin embargo a pesar de que se observa la tendencia anorexigénica del GALP, los valores obtenidos no representan una diferencia estadística significativa ($p>0.05$).

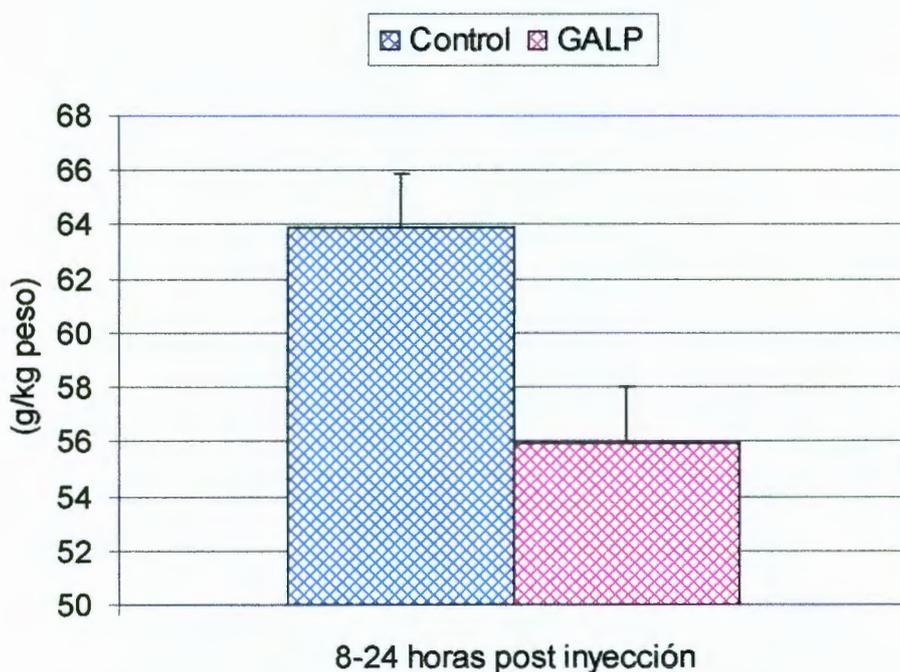


Figura No 20 Ingestión Dietética 8-24 horas post inyección

VII.2.3 Temperatura corporal

Los resultados obtenidos durante esta segunda fase del trabajo de investigación muestran que, desde el momento en que se realizó la inyección del neuropeptido hasta las 23.5 horas post-inyección éste produce un aumento en la temperatura corporal de las ratas, efecto que se mantiene constante durante todo el periodo de monitoreo, sin embargo es importante hacer notar, que dicho efecto es más contundente durante las primeras 8 horas, periodo en el cual la diferencia de temperatura es estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Después de las 8 horas post inyección, una vez que se ha alcanzado un máximo en la temperatura corporal de los animales, se comienza a observar una disminución de la temperatura corporal. Es importante señalar que a pesar de que la diferencia entre el grupo GALP y el de control disminuye; la tendencia se mantiene constante, a pesar de esto, el efecto generado por el GALP en el periodo global estudiado (0-24 horas post inyección) no resultó ser estadísticamente significativo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación concuerdan con los alcanzados en estudios anteriores^{8, 12, 19, 23,24} los cuales han demostrado que el GALP causa un incremento significativo en la temperatura corporal de las ratas macho durante 24 horas post inyección. Es probable, que en este experimento los resultados alcanzados en el incremento de la temperatura no hayan sido estadísticamente significativos debido al brusco aumento observado a las 8 horas de post inyección en ambos grupos experimentales (ver Figura No 21) lo que se podría explicar debido al hecho de que las ratas se encontraban en cámaras metabólicas y no en sus jaulas, lo cual provocó un aumento en la temperatura de ambos grupos y muy probablemente sesgó el efecto directo del GALP.

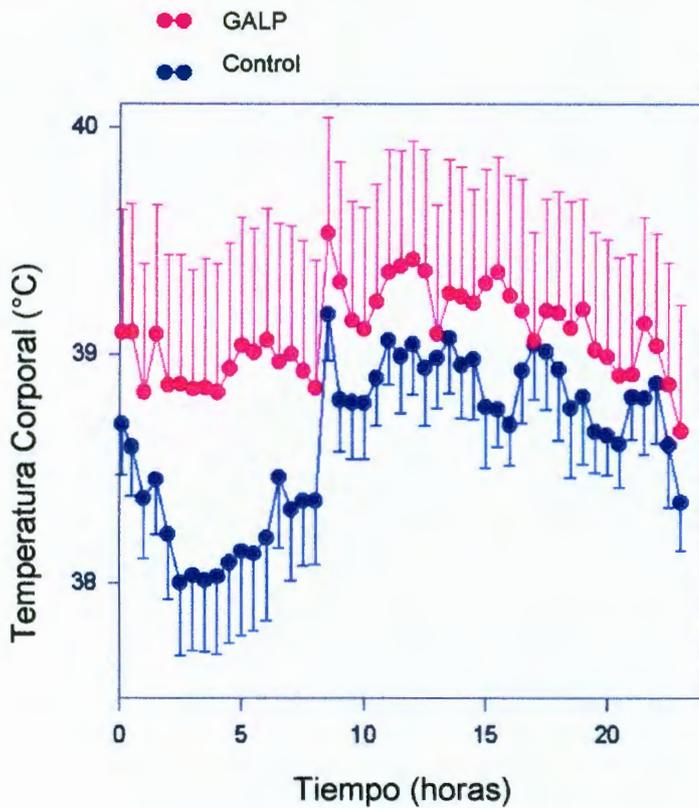


Figura No 21 Temperatura corporal 0-24 horas post inyección

VII.2.4 Tasa metabólica (consumo de Oxígeno)

En cuanto al efecto del GALP en la tasa metabólica, los resultados alcanzados en el trabajo experimental sugieren que produjo un incremento en ésta; incremento que resultó ser estadísticamente significativo ($p < 0.01$) a partir de que había transcurrido la primera hora de que la inyección del GALP se había realizado. El aumento observado en el experimento concuerda con el obtenido en la parte final de la prueba piloto, en donde una vez transcurridas 1.5 horas de post inyección se suspendió la medición de la tasa metabólica.

Como se puede apreciar en la Figura No 22 el efecto el GALP alcanza su máximo entre las 2.5 y 4 horas de que ha sido suministrado; en el lapso de 3.5 a 4 horas su efecto produce que el consumo de oxígeno en las ratas inyectadas con GALP se duplique. Conviene agregar que el incremento en el consumo de Oxígeno concuerda con el aumento en la temperatura observado en las ratas inyectadas con GALP.

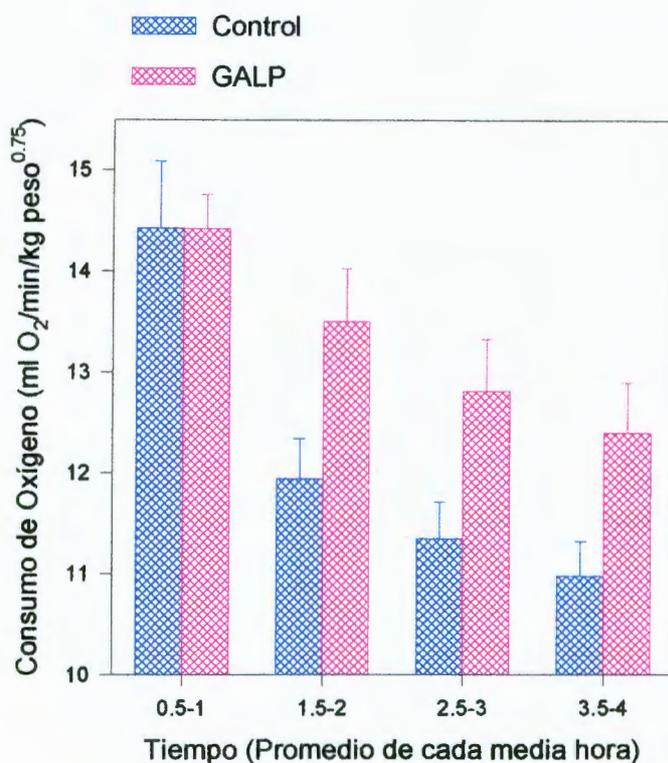


Figura No 22 Tasa metabólica 0-4 horas post inyección

Por otra parte, en la Figura No 23 se puede apreciar que el efecto del GALP sobre el consumo de Oxígeno, comienza a disminuir transcurridas las 5 horas post inyección, sin embargo las ratas inyectadas con el neuropéptido siguen manteniendo un consumo de Oxígeno mayor que el del grupo control sólo que en este caso ya no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). Estos resultados demuestran que la administración central del GALP incrementa por varias horas de manera significativa ($p < 0.01$) la tasa metabólica (Figura No 24) aspecto que sugiere que el GALP podría ser un mediador hipotalámico en cuanto al incremento de tasa metabólica y por ende de gasto energético.

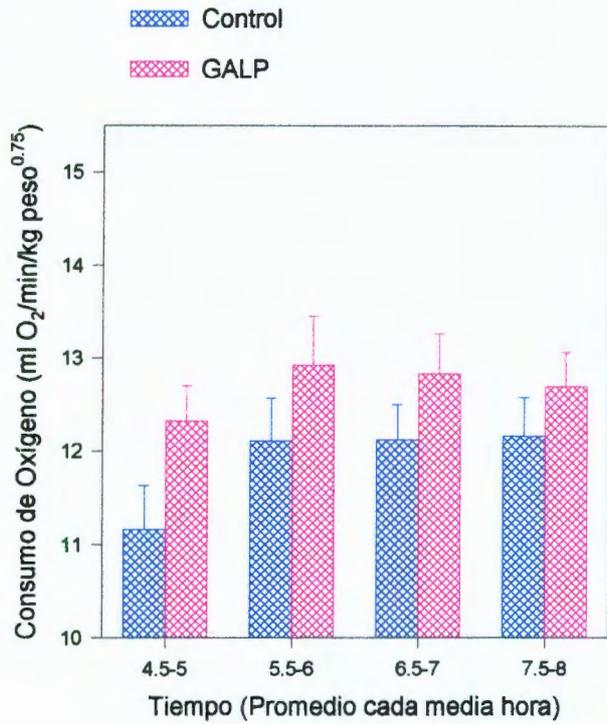
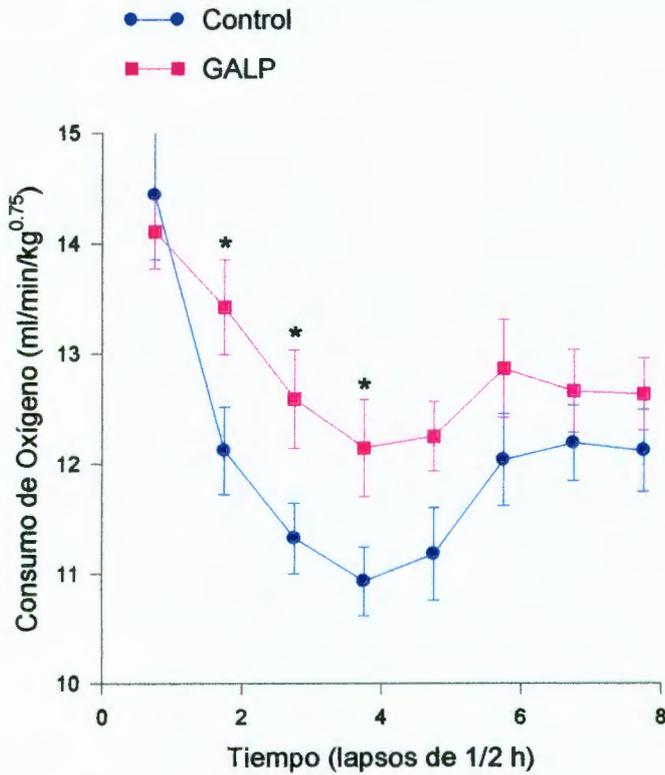


Figura No 23 Tasa metabólica 4-8 horas post inyección



* p<0.05

Figura No 24 Tasa metabólica completa de 0-8 horas post inyección

VII 2.5 Nivel de actividad motora

Ambos grupos, tanto el grupo control como el grupo inyectado con GALP, mostraron un incremento en la actividad motora (Figura No 25) una vez que eran transferidos de las cámaras metabólicas a sus respectivas jaulas, sin embargo la administración por sí misma del GALP no produjo un aumento en la actividad. La ANOVA de la actividad motora sugiere la existencia de un efecto significativo del tiempo sobre ésta ($p < 0.0001$) pero no se aprecia un efecto del GALP en ella, ni una interacción significativa entre GALP y tiempo, estos resultados sugieren que el aumento en el consumo de Oxígeno y temperatura corporal no se debe a un aumento en la actividad física, sino al propio efecto de la inyección de dicho neuropéptido.

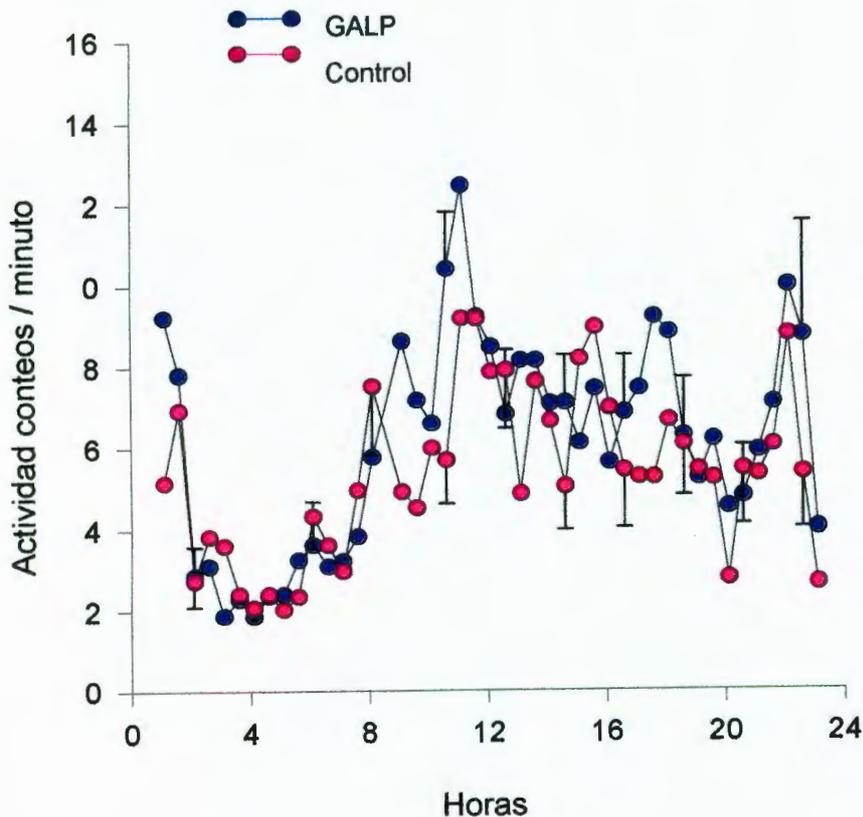


Figura No 25 Nivel de actividad motora 0-24 horas post inyección

VIII. CONCLUSIONES

- Investigaciones anteriores han reportado que la administración central del GALP incrementa la ingesta dietética así como la temperatura corporal, sin embargo esta es la primera investigación que demuestra que la administración intra cerebro ventricular (i.c.v) del GALP también aumenta la tasa metabólica en ratas por varias horas, esto sugiere que el GALP podría ser un mediador hipotalámico el cual afecta la tasa metabólica y el gasto energético como respuesta a un aumento en los niveles de hormonas metabólicas como la leptina e insulina.
- La administración del GALP a través de las cánulas intra cerebro ventriculares (i.c.v.) estimula el metabolismo, lo cual se observó en un aumento del consumo de Oxígeno ($\text{ml}/\text{min}/\text{Kg}^{0.75}$); el aumento en el consumo de Oxígeno fue visible durante las ocho horas post inyección.
- El aumento en el consumo de Oxígeno no se relaciona con el incremento de la actividad motora y es independiente de la ingestión.
- Se observó un aumento en la temperatura corporal de las ratas, esto pudo observarse sólo en el experimento y no, en la prueba piloto, ya que en esta la toma de temperatura mediante termómetro rectal no fue correcta debido a la incomodidad que esto presentaba para las ratas, lo cual conducía a un aumento de la movilidad de los roedores y producía un sesgo al momento de la medición de la temperatura
- El incremento en la temperatura corporal de las ratas es consistente en cuanto al aumento del consumo de Oxígeno, lo cual podría sugerir que el aumento en la temperatura conduce a un aumento en el consumo de Oxígeno.
- En lo referente a la ingesta, el GALP ejerce un efecto inicial orexigénico (antes de las 8 horas post inyección) seguido de un visible efecto anorexigénico post 24 horas de la inyección.

- A pesar de este efecto orexigénico, el peso de las ratas 24 horas post inyección disminuyó significativamente.
- Debido a que los resultados sugieren que el neuropéptido GALP incrementa el gasto energético, se podría pensar que dicho neuropéptido podría jugar un rol importante en la regulación hipotalámica del peso corporal e ingestión, lo cual de una u otra manera se correlaciona con el sobrepeso y obesidad.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

- Por lo anterior la investigación realizada sugiere que una interrupción en el funcionamiento normal del GALP podría causar desórdenes metabólicos, tales como diabetes, sobrepeso u obesidad y probablemente un efecto en ciertos trastornos de la conducta alimentaria como Anorexia Nervosa y Bulimia Nervosa.

X. LITERATURA CITADA

1. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo. www.paho.org/Spanish/AD/DPC/NC/obesity.htm - 20k. 2002. Fecha de consulta: septiembre de 2005.
2. Victoria Mendizábal. La compleja obesidad de cada día. www.biomed.net/biomed/d01040704.htm - 22k . Universidad Pompeu Fabra. Julio 2004. Fecha de consulta: octubre de 2005.
3. Frenk J, Frejke T, Bobadilla JL, Stern C, Ozano R, Sepúlveda J. 1991. La transición epidemiológica en América Latina. *Bol Oficina Sanit Panam.* 111:485-496.
4. Chiprut Roberto, Castellanos-Urdaibay Alejandro, Martínez-García Daniel, Cortez María Elena-, Chiprut Rebecca. 2001. La obesidad en el siglo xx avances en la etiopatogenia y tratamiento. *Gac Med Mex* . Vol. 137(4): 323-334. scielo-mx.bvs.br/scielo.php?pid=S0016-38132001000400005&script=sci_arttext - 48k -. Fecha de consulta: septiembre de 2005
5. Joaquín Bolaños Vanesa. 2001. 1% de la población mundial sufre de anorexia o bulimia. *Comunidad.*1330(2):15-19.
6. Aguilera Barreiro A, Rodríguez Dimitrescu C, Bahena Sánchez CL, Trejo Hurtado MT. Estudio descriptivo del riesgo de trastornos de la conducta alimentaria en el estado de Querétaro. *Revista de Salud Pública de México.* En revisión para publicación número 06182.
7. Fraley G, Scarlett M, Shimada I, Teklemichael D, Acohido B, Clifton D, Steiner R. 2004. Effects of Diabetes and Insulin on the Expression of Galanin-Like Peptide in the Hypothalamus of the Rat. *Diabetes* 53:1237-42.

8. Matsumoto Y, Watanabe T, Adachi Y, Itoh T, Ohtaki T, Onda H, Kurokawa T, Nishimura O, Fujino M. 2002. Galanin-like peptide stimulates food intake in the rat. *Neurosci Lett* 322:67-9.
9. Lee JH, Reed DR, Price RA. 2001. Leptin resistance is associated with extreme obesity and aggregates in families. *Int Obes Relat Metab Disord.*; 25:1471-1473.
10. Campfield L, Smith F, Gulsez Y et al. 1995. Mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 269:546-549.
11. Clement K, Vaisse C, Lahlou N et al. 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 392: 398-401.
12. Hansen K, Krasnow S, Nolan M, Fraley S, Baumgartner J, Clifton D, Steiner R. 2003. Activation of the Sympathetic Nervous System by Galanin-Like Peptide-A possible Link between Leptin and Metabolism. *Endocrinology*. 144:4709-17
13. Teasdale TW, Sorensen TI, Stunkard AJ. 1990. Genetic and early environmental components in sociodemographic influences on adult body fatness. *Br Med J*.300: 1615-1618.
14. Lawrence CB, Williams T, Luckman SM. 2003. Intracerebroventricular galanin-like peptide induces different brain activation compared with galanin. *Endocrinology*. 144:3977-84
15. Stunkard AJ. 1972. New therapies for the eating disorders: Behavior modification of obesity and anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatr*. 26:391-989.
16. Hoek HW, Van Hoeken D. 2003. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. *Int J Eat Disord*. 34(4):383-96.

17. Cunningham M. 2004. Galanin-like peptide as a link between metabolism and reproduction, *J Neuroendocrinol.* 6(8):717-23
18. Lee JH, Reed DR, Price RA. 2001. Leptin resistance is associated with extreme obesity and aggregates in families. *Int Obes Relat Metab Disord.* 25: 1471-1473.
19. Campfield L, Smith F, Gulsez Y et al. 1995. Mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 269: 546-549.
20. Clement K, Vaisse C, Lahlou N et al. 1998. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398-401.
21. Tan M, Günlach A, Morris M. 2005. Exaggerated feeding response to central galanin-like peptide administration in diet-induced obese rats, *Neuropeptides Elsevier.* 39; 333-336.
22. Gerard J. Tortora. 2002. *Principios de Anatomía y Fisiología.* (novena edición), Oxford University Press. México.
23. Guyton Arthur, Hall John. 1999. *Tratado de Fisiología Médica* (decima edición). Mc Graw Hill. México.
24. Medline Plus: La Hipófisis como Glándula Endocrina (Glándula pituitaria). www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/pituitarydisorders.html - 23k. Fecha de consulta: septiembre de 2005
25. Medline Plus. La Glándula Pituitaria (The pituitary Gland) www.healthsystem.virginia.edu/uvahealth/adult_endocrin_sp/pitgland.cfm - 18k. Fecha de consulta: septiembre de 2005.

26. Donald K. Clifton. 2005. Basic Neuroendocrinology and the anatomy of the hypothalamus. Apuntes de Anatomía de la Universidad de Washington, Seattle Washington, USA.
27. Cunningham MJ, Shahab M, Grove KL, Scarlett JM, Plant TM, Cameron JL, Smith M, Clifton D, Steiner R. 2004. Galanine-like peptide as a possible link between metabolism and reproduction in the macaque, *J Clinical Endocrinology and Metabolism*; 89(4):1760-6.
28. Stephan CM, Bailey ST, Bat S et al. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 292-293.
29. Janke J, Engeli S, Gorzelnik K et al. 2002. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res.* 10:1-5.
30. Lang R, Berger A, Santic R, Geisberger R, Hermann A, Herzog H, Kofler B, 2005. Pharmacological and functional characterization of galanin-like peptide fragments as potent galanin receptor agonists, *Neuropeptides* 39:179-184.
31. Stoyanovitch AG, Johnson MA, Clifton DK, Steiner RA, Fraley GS 2005 Galanin-like peptide rescues reproductive function in the diabetic rat. *Diabetes* 54:2471-6
32. Saito J, Ozaki Y, Kawasaki M, Ohnishi H, Okimoto N, Nakamura T, Ueta Y. 2005. Induction of galanin-like peptide gene expression in the arcuate nucleus of the rat after acute but not chronic inflammatory stress. *J Brain and Molecular*, 18; 133(2):233-41.
33. Shen J, Gundlach AL, 2004. Galanin-like peptide mRNA alterations in arcuate nucleus and neural lobe of streptozocin-diabetic and obese Zucker rats. Further evidence for leptin-dependent and independent regulation, *Neuroendocrinology*.;79 (6):327-37.

34. Seth A, Stanley S, Dhillo W, Murphy K, Ghatei M, Bloom S. 2003 Effects of galanin-like peptide on food intake and the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Neuroendocrinology* 77:125-31
35. Krasnow SM, Fraley GS, Schuh SM, Baumgartner JW, Clifton DK, Steiner RA. 2003 A role for galanin-like peptide in the integration of feeding, body weight regulation, and reproduction in the mouse. *Endocrinology* 144:813-22
36. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2004 Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 15:215-21
37. Wikipedia, la enciclopedia libre Neuropéptido. Se han secuenciado alrededor de 100 neuropéptidos de diferentes fuentes biológicas. es.wikipedia.org/wiki/Neuropéptido - 12k. Fecha de consulta: septiembre de 2005.
38. E – Medicum. com. Journals de Neuropeptidos. Más de 260 áreas del conocimiento de Ciencias Médicas con todos los recursos para una profunda Investigación. www.e-medicum.com/journals/areas/verArea/Neuropeptidos0.php - 37k. Fecha de consulta: septiembre de 2005.
39. Ana Martínez, Begoña Gómez Miguel. Grupo de Mecanismos de Acción de Neuropeptidos. 2005. www.bbm1.ucm.es/res/neuropeptidos/neuro.html - 6k. Fecha de consulta: septiembre de 2005.
40. Marks DL, Smith MS, Vrontakis M, Clifton DK, Steiner RA. 1993. Regulation of galanin gene expression in gonadotropin-releasing hormone neurons during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*. 132:1836-1844.
41. Jacobowitz D, M. 1988. Multifactorial control of pituitary hormone secretion: the “wheels” of the brain. *Synapse*. 2:186-192.

42. Wikipedia, la enciclopedia libre. Péptido es. wikipedia.org/wiki/Péptido - 21k - Fecha de consulta: septiembre de 2006
43. Monografias. El SNH. www.monografias.com/trabajos11/sisne/sisne.shtml - 62k.. Fecha de consulta: septiembre de 2005.
44. Vallet PG, Charnay Y, Bouras C. 1990. Distribution and colocalization of delta sleep-inducing peptide and luteinizing hormone-releasing hormone in the aged human brain: an immunohistochemical study. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 3:207-214.
45. Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K. 1991. Neurotensin and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat. *Neuroscience*. 133:183-186.
46. Niimi M, Takahara J, Sato M, Kawanishi K. 1992. Identification of dopamine and growth hormone-releasing factor-containing neurons projecting to the median eminence of the rat by combined retrograde tracing and immunohistochemistry. *Neuroendocrinology*. 55:92-96.
47. Shioda S, Nakai Y, Sato A, Sunayama S, Shimoda Y. 1986. Electron microscopic cytochemistry of the catecholaminergic innervation of TRH neurons in the rat hypothalamus. *Cell and tissue research*. 245:247-252.
48. Kiss J, Halasz B. 1990. Ultrastructural analysis of the innervation of TRH-immunoreactive neuronal elements located in the periventricular subdivision of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain research*. 532:107-114.
49. Toni R, Jackson IM, Leachan RM. 1990. Neuropeptide-Y immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 126:2444-2453.

50. Piekut DT, Joseph SA. 1990. Co-existence of CRF peptide and oxytocin mRNA in the paraventricular nucleus. *Peptides*. 11:621-624.
51. Abe H, Engler D, Molitch ME, Bollinger-Gruber J, Reichlin S. 1985. Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. *Endocrinology*. 116:1383-1390.
52. Nikolics K, Mason AJ, Szönyi E, Ramachandran J, Seeburg PH. 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature*. 316:511-517.
53. Samson WK, Lumpkin MD, McCann SM. 1986. Evidence for a physiological role for oxytocin in the control of prolactin secretion. *Endocrinology*. 119:554-560.
54. Belchetz PE, plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 202:631-633.
55. Lawrence CB, Baudoin FM, Luckman SM 2002 Centrally administered galanin-like peptide modifies food intake in the rat: a comparison with galanin. *J Neuroendocrinol* 14:853-60
56. Virtual Health Library. WHO. 2005. Galanin-Like Peptide. regional.bvsalud.org/php/decsws.php?tree. Fecha de consulta: 15 de octubre de 2005.
57. Dagogo-Jack S. 2001. Human leptine regulation and promise pharmacotherapy. *Curr Drug Targets*. 2: 181-195.
58. Wang J, Akabayashi A, Joon H, Dourmashkin J, Silva I, Lighter J, Leibowitz S. 1998. Hypothalamic galanin: control by signals of fat metabolism. *Brain Research*. 804: 7-20.

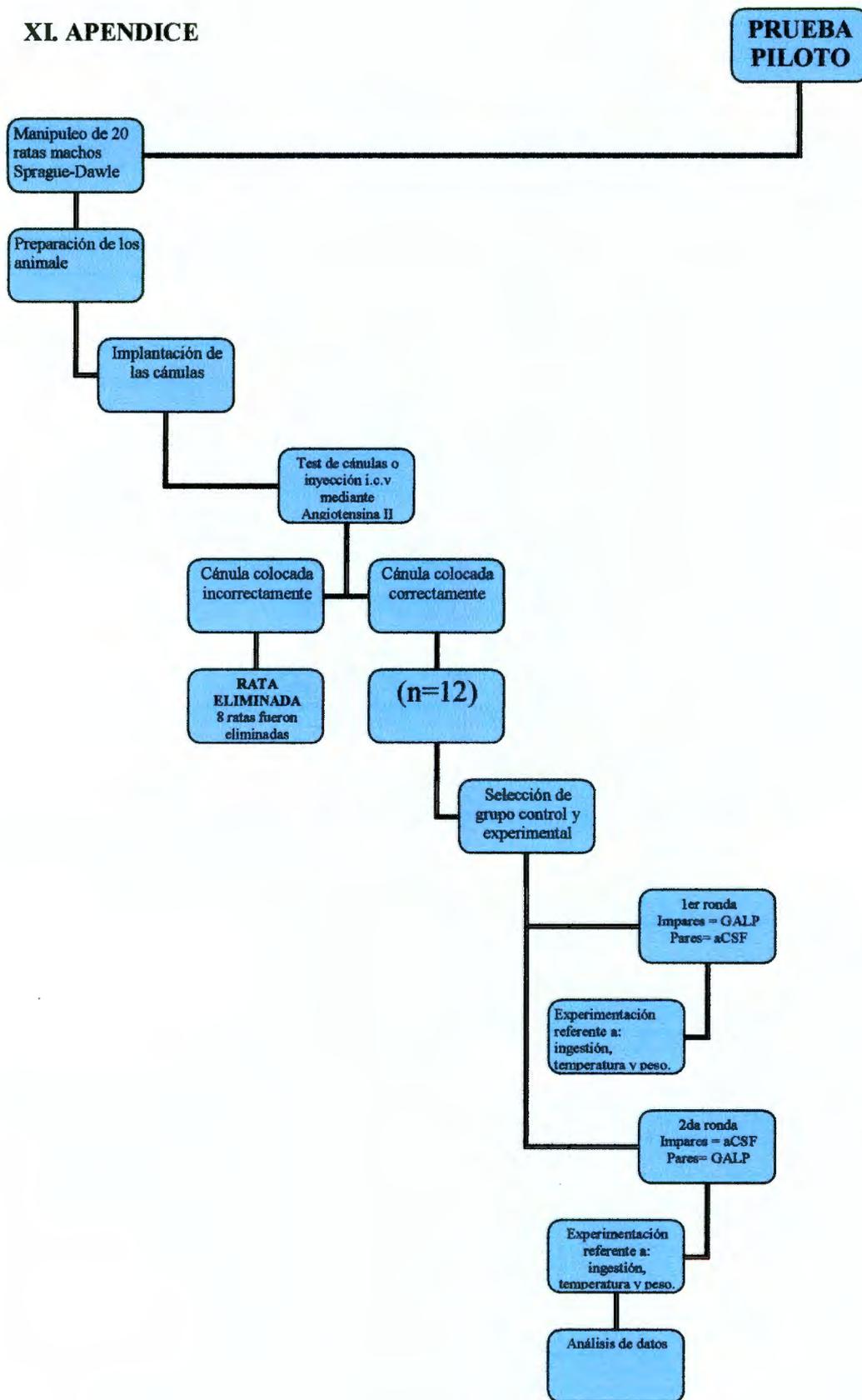
59. Das UN. 2001. Is obesity and inflammatory condition? *Nutrition*;17: 953-966.
60. Sawchenko PE. 1998. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity. *J Comp Neurol.* 402,435-441.
61. Finn, P.D. 2001. Galanin's functional significance in the regulation of the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Neuroendocrinology.* 71, 16-26.
62. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA.1997 Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138:855-8
63. Krasnow SM, Schuh SM, Teklemichael DN, Leilibadi SN, Baumgartner J, Clifton DK, Steiner RA. 2002. Galanin-like peptide (GALP) influences feeding, body weight and reproduction in the mouse. *Proceedings of the Endocrine Society, San Francisco, CA.*
64. Hwa JJ, Fawzi AB, Graziano MP, Ghibaudi L, Williams P, Van Heek M, Davis H, Rudinski M, Sybertz E, Strader CD.1997.Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am J Physiol* 272:R1204-9.
65. Matsumoto H, Noguchi J, Takatsu Y, Horikoshi Y, Kumano S, Ohtaki T, Kitada C, Itoh T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. 2001. Stimulation effect of galanin-like peptide (GALP) on luteinizing hormone-releasing hormone-mediated luteinizing hormone (LH) secretion in male rats. *Endocrinology* 142:3693-6.
66. Fraley GS, Shimada I, Baumgartner JW, Clifton DK, Steiner RA. 2003. Differential patterns of Fos induction in the hypothalamus of the rat following central injections of galanin-like peptide and galanin. *Endocrinology* 144:1143-6
67. Cunnningham MJ, Krasnow SM, Gevers EF, Chen P, Thompson CK, Robinson IC, Smith MS, Clifton DK, Steiner RA. 2004. Regulation of galanin-like peptide gene expression by pituitary hormones and their downstream targets. *J Neuroendocrinol* 16:10-8

68. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2004. Galanin-like peptide as a link in the integration of metabolism and reproduction. *Trends Endocrinol Metab* 15:215-21
69. Seth A, Stanley SA, Dhillo W, Murphy KG, Bloom SR. 2002. The novel hypothalamic peptide Galanin-Like Peptide (GALP) stimulates food intake in male wistar rats. *Endocrine Abstracts* 2:OC17
70. Makimura H, Mizuno TM, Yang XJ, Silverstein J, Beasley J, Mobbs CV. 2001. Cerulenin mimics effects of leptin on metabolic rate, food intake, and body weight independent of the melanocortin system, but unlike leptin, cerulenin fails to block neuroendocrine effects of fasting. *Diabetes* 50:733-9.
71. Stehling O, Doring H, Ertl J, Preibisch G, Schmidt I. 1996. Leptin reduces juvenile fat stores by altering the circadian cycle of energy expenditure. *Am J Physiol* 271:R1770-4
72. Stehling O, Doring H, Nuesslein-Hildesheim B, Olbort M, Schmidt I. 1997. Leptin does not reduce body fat content but augments cold defense abilities in thermoneutrally reared rat pups. *Pflugers Arch* 434:694-7
73. Sivitz WI, Fink BD, Morgan DA, Fox JM, Donohoue PA, Haynes WG. 1999. Sympathetic inhibition, leptin, and uncoupling protein subtype expression in normal fasting rats. *Am J Physiol* 277:E668-77
74. Gundlach AL. 2002. Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol* 440:255-68.
75. Ruffin M, Nicolaidis S. 2000. Intracerebroventricular injection of murine leptin enhances the postprandial metabolic rate in the rat. *Brain Res* 874:30-6

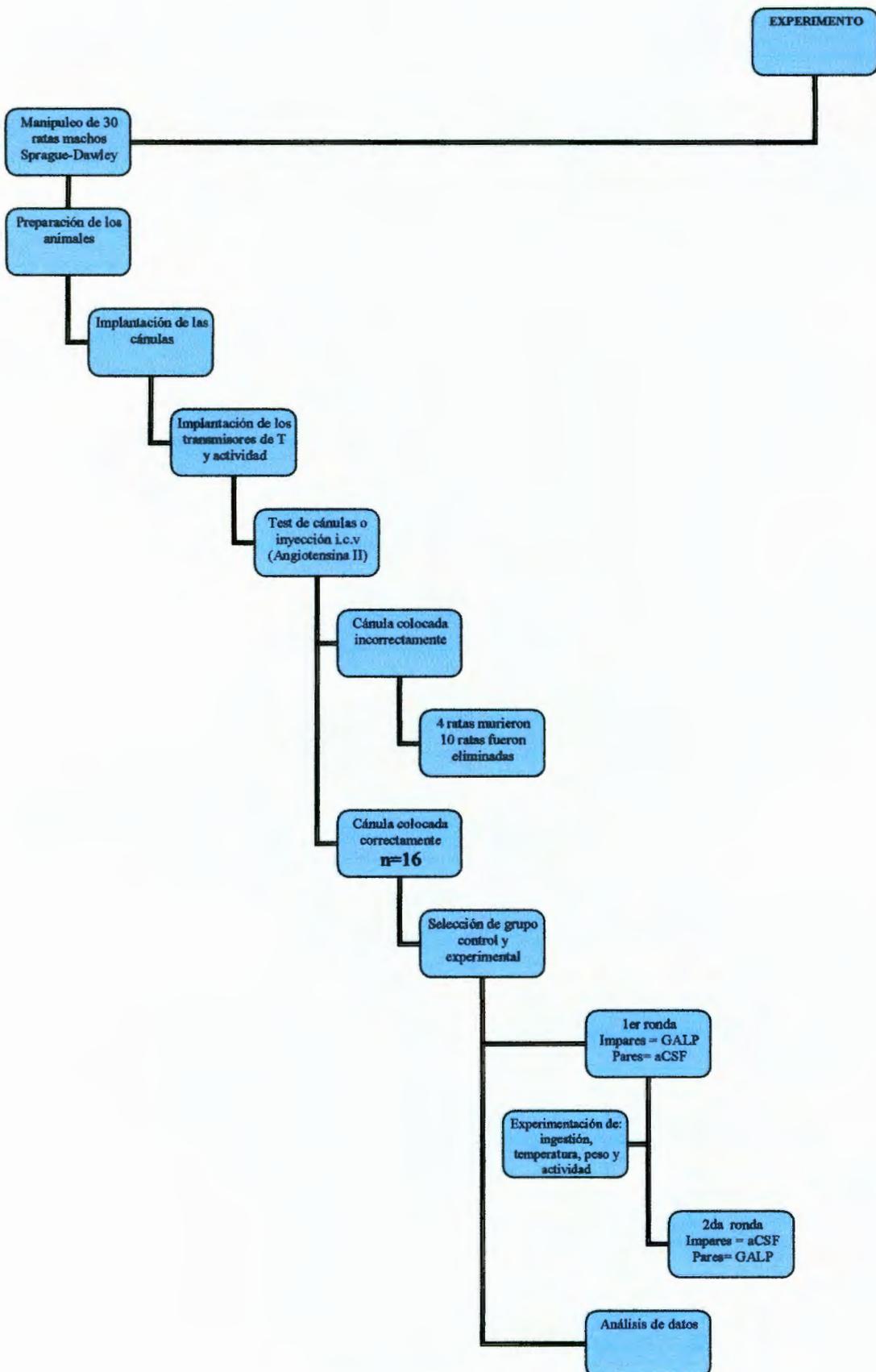
76. Marchal-Victorion S, Vionnet N, Escrieut C et al. 2002. Genetic, pharmacological and functional analysis of cholecystokinin- and cholestyramine-2 receptor polymorphism in type 2 diabetes and obese patients. *Pharmacogenetics*; 12: 23-30.
77. Hu B, Ellingboe J, Hans S et al. 2002. (4-piperidin-1-yl)phenyl-amides: potent and selective human - (3) agonists. *J Med Chem* 26: 1456-1466.
78. Margareto J, Larrarte E, Martí A, Martínez JA. 2002. Up-regulation of a thermogenesis-related gene (UCP1) and down-regulation of PPARgamma and P2 genes in adipose tissue: Possible features of the antiobesity effects of beta 3 adrenergic agonists. *Biochem Pharmacol* 15: 1471-1478
79. Stanley BG, Leibowitz SF. 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:3940-3.
80. Wittmann G, Sarkar S, Hrabovszky E, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. 2004. Galanin- but not galanin-like peptide-containing axon terminals innervate hypothalamic TRH-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1002:43-50
81. Wang T, Hartzell DL, Rose BS, Flatt WP, Hulsey MG, Menon NK, Makula RA, Baile CA. 1999. Metabolic responses to intracerebroventricular leptin and restricted feeding. *Physiol Behav* 65:839-48
82. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. 1997. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138:2569-76
83. Piekut DT, Joseph SA. 1986. Coexistence of CRF peptide and vasopressin immunoreactivity in parvocellular paraventricular neurons of rat hypothalamus. *Peptides* 7:891-898.

84. Nikolics K, Mason AJ, Szönyi E, Ramachandran J, Seeburg PH. 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. *Nature* 316:511-517.
85. Ceccatelli S, Erikson M, Hokfelt T. 1989. Distribution and coexistence of corticotrophin-releasing factor, neurotensin, enkephalin, cholecystokinin, galanin and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 49:309-323.
86. Gregoire FM, Smas CM, Sook Sul H. 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 78: 783-809.
87. Tansey JT, Sztalryd C, Gruia-Gray J et al. 2001. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci* 98: 6494-6499.
88. Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K. 2001. Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 27: 121-124.
89. Kennedy GC. 1953. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B140*: 579-592.
90. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M et al. 2001. Leptine activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411: 480-484.

XI. APENDICE



Apéndice No 1 Diagrama de flujo de la prueba piloto



Apéndice No 2 Diagrama de flujo del experimento