



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química



Maestría en Ciencias Químico Biológicas

“MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES  
A SEROTONINA 5-HT<sub>2C</sub> Y 5-HT<sub>5A</sub> EN EL HIPOCAMPO DE  
RATAS CON OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA”

## TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

Q.F.B. Sarahi López Esparza

**Dirigido por:**

Dra. María Guadalupe García Alcocer

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. OCTUBRE 2014



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

“Modificaciones en la expresión de receptores a serotonina 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas con obesidad inducida por dieta”

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**  
Q.F.B. Sarahi López Esparza

Dirigido por:  
Dra. María Guadalupe García Alcocer

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
Presidente



Firma

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Secretario

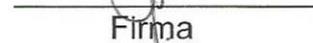


Firma

Dr. Alfonso Cáramez Trejo  
Vocal

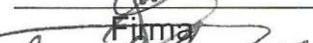
Firma

Dra. Teresa Edith Garay Rojas  
Suplente



Firma

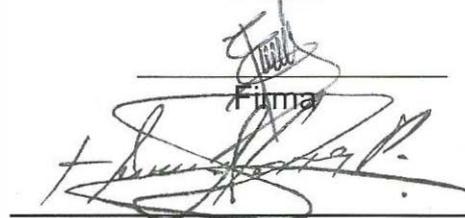
M. en C. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Suplente



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad de Química



Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre, 2014  
México

## RESUMEN

La regulación del consumo de alimentos es un mecanismo complejo en el cual se involucran sustancias endógenas y estructuras del sistema nervioso central como el hipotálamo e inclusive el hipocampo. El neurotransmisor serotonina (5-HT) es reconocido como mediador del control de la ingesta de alimentos; entre sus múltiples receptores los 5-HT<sub>2C</sub> tienen caracterizada su acción inhibidora del apetito, sin embargo de los receptores 5-HT<sub>5A</sub> no se posee información sobre su implicación en la obesidad; además se desconoce si existen cambios de expresión de estos receptores en el hipocampo de ratas con obesidad inducida por una dieta alta en energía (HED) y suplementada con triptófano (TRP). La metodología consistió en inducir la obesidad a ratas *Sprague Dawley* jóvenes mediante una dieta alta en energía y suplementada con triptófano para luego determinar el patrón de expresión de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo. Se utilizaron como técnicas la inmunohistoquímica y el *western blot* para conocer la distribución y cuantificar la expresión proteica de los receptores. Las ratas con dieta HED desarrollaron obesidad a partir de la semana 13 de tratamiento; las diferentes dietas no afectaron los niveles de glucosa y la dieta HED+TRP disminuyó significativamente el colesterol sérico. Las ratas con dietas control consumieron más agua y alimento que aquellas con dieta HED y HED+TRP. La expresión de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> disminuyó en CA1, CA2, CA3 y DG en el grupo HED y en CA2, CA3 y DG para el grupo HED+TRP. La expresión de los receptores 5-HT<sub>5A</sub> disminuyó únicamente en el DG del grupo HED. Los cambios en el nivel de expresión de los receptores, ayudará a comprender más los múltiples mecanismos que influyen en el desarrollo de la obesidad y dará pauta a futuras investigaciones para elucidar y comprender su función en el hipocampo, servirá como base para la obtención de fármacos, destinados a controlar el peso corporal.

**(Palabras clave:** 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, Dieta Alta en Energía, Hipocampo, Obesidad)

## SUMMARY

The food intake regulation is a complex mechanism that involves endogenous substances in central nervous system structures like the hypothalamus or even the hippocampus. The neurotransmitter serotonin (5-HT) is distinguished as mediator of food intake control, within their multiples receptors, the 5-HT<sub>2C</sub> type had characterized its inhibitory action of appetite, however of 5-HT<sub>5A</sub> receptors there is no information about their involvement in obesity disease; also it is unknown if there are receptors expression changes in rat hippocampus with diet induced obesity through a high energy diet (HED) and supplemented with tryptophan (TRP). The methodology was inducing obesity to young *Sprague Dawley* rats through a high energy diet and supplemented with tryptophan to know the receptors hippocampus expression pattern. Also it has been used immunocytochemical and western blot techniques to know the receptor distribution and quantify the protein expression. The rats with HED diet develop obesity since treatment week 13; the different diets do not affected the glucose levels and the HED+TRP diet significantly decreased the serum cholesterol. The rats with control diet consumed more water and food than those with HED diet. The 5-HT<sub>2C</sub> receptor expression decreased in CA1, CA2, CA3 and DG of HED group and CA2, CA3 and DG for HED+TRP group. The 5-HT<sub>5A</sub> receptor expression only decreased in DG for HED group. The level changes in receptor expression, will help to understand more the multiples mechanisms that influence obesity development and will serve as a guideline for future investigations to elucidate and recognize their function in the hippocampus, as well as future basis for drug obtaining, destined to control body weight.

**(Keywords:** 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, High Energy Diet, Hippocampus, Obesity)

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios por darme la fortaleza y el coraje necesarios para concretar otro objetivo en mi vida. A mis padres por enseñarme a trabajar arduamente y por el gran amor que me muestran día con día. A mi hermana por escucharme, darme ánimos y hacerme reír en aquellos días en los que el ánimo decaía. A mi directora de tesis por no solo preocuparse de mi formación como investigadora, sino también de mi desarrollo personal. A todos los compañeros del laboratorio UIG. A aquellos amigos con los que sé que siempre podré contar.

## **AGRADECIMIENTOS**

Reconozco las facilidades otorgadas por la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro para mi formación y agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo a través del Fondo Mixto de Fomento a la investigación Científica y Tecnológica CONACyT – Gobierno del Estado de Querétaro (FOMIX-QRO) convocatoria 2012-01, No. QRO-2012-C01-192954.

Agradezco a la Dra. Ma. Guadalupe García-Alcocer por su guía para la elaboración de esta tesis y a la Dra. Laura Berumen por sus valiosas observaciones pero sobre todo por su disposición al momento de las asesorías.

Sinceras gracias a: Dr. Alfonso Cárbaz, Dra. Edith Garay y M. en C. Jesica Escobar por aceptar ser mis sinodales, por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo a pesar de las múltiples actividades que los ocupan.

## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
RESUMEN .....	2
SUMMARY .....	3
TABLA DE CONTENIDOS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
ÍNDICE DE FIGURAS .....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	11
II. ANTECEDENTES .....	13
2.1 Obesidad .....	13
2.2 Dieta occidental .....	18
2.3 Hambre y saciedad.....	19
2.3.1 Moléculas orexigénicas y anorexigénicas.....	20
2.4 El cerebro como centro del control del consumo de alimentos.....	21
2.4.1.1 Hipocampo y dietas altas en energía.....	27
2.5 Neurotransmisores .....	28
2.6 Receptores .....	30
2.7 Serotonina .....	30
2.8 L-triptófano .....	32
2.4 Receptores a serotonina.....	33
2.7 Obesidad y receptores a serotonina.....	36
2.8 Obesidad y receptores a serotonina en el hipocampo.....	39
III. JUSTIFICACIÓN .....	42
IV. HIPÓTESIS .....	44

V. OBJETIVOS.....	45
5.1 Objetivo General.....	45
5.2 Objetivos Específicos .....	45
VI. METODOLOGÍA.....	46
6.1 Reactivos.....	46
6.2 Materiales .....	47
6.3 Equipos.....	48
6.5 Inducción de la obesidad.....	49
6.6 Medición de parámetros bioquímicos .....	49
6.7 Inmunohistoquímica .....	50
6.7.1 Densitometría.....	51
6.8 <i>Western blot</i> .....	52
6.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido .....	52
6.8.2 Cuantificación de proteínas.....	52
6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE .....	53
6.8.4 Electrotransferencia .....	54
6.8.5 <i>Blotting</i> .....	54
6.8.6 Detección y revelado.....	54
6.9 Análisis estadístico.....	55
VIII. RESULTADOS.....	56
8.1 Inducción de la obesidad.....	56
8.2 Medición de parámetros bioquímicos .....	57
8.3 Consumo de alimento.....	58
8.4 Consumo de agua .....	59

8.5 Determinación de los niveles de expresión de receptores 5-HT <sub>2C</sub> y 5-HT <sub>5A</sub> por inmunohistoquímica.....	60
8.6 Cuantificación de receptores 5-HT <sub>2C</sub> y 5-HT <sub>5A</sub> por <i>western blot</i> .....	66
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	70
X. CONCLUSIONES.....	77
XI. REFERENCIAS.....	79
XII. APENDICE .....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Ejemplos de moléculas reguladoras del apetito	21
2. Clasificación de los principales neurotransmisores	29
3. Clasificación de la familia de receptores a serotonina	34
4. Receptores serotoninérgicos relacionados con obesidad	37
5. Preparación de curva de calibración de proteínas	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Principales vías de señalización de la serotonina	35
2. Incremento de peso corporal	56
3. Glucosa plasmática	57
4. Colesterol total	58
5. Consumo de alimento	59
6. Consumo de H <sub>2</sub> O	60
7. Tejidos blancos	61
8. Marca inmunorreactiva en neuronas hipocampales	62
9. Inmunohistoquímica de 5-HT <sub>2C</sub> para CTR y HED	63
10. Inmunohistoquímica de 5-HT <sub>2C</sub> para CTR+TRP y HED+TRP	64
11. Inmunohistoquímica de 5-HT <sub>5A</sub> para CTR y HED	65
12. Inmunohistoquímica de 5-HT <sub>5A</sub> para CTR+TRP y HED+TRP	65
13. Resumen de resultados para el <i>Western blot</i> de 5-HT <sub>2C</sub> y 5-HT <sub>5A</sub>	67
14. Resumen de resultados inmunohistoquímicos de 5-HT <sub>2C</sub> y 5-HT <sub>5A</sub>	69

## I. INTRODUCCIÓN

La obesidad es la actualidad un grave problema de salud en México según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el año 2012, aproximadamente el 26.8% de los hombres y el 37.5% de las mujeres mayores de 20 años que conforman la población adulta padecen la enfermedad, provocando gastos exorbitantes en recursos del presupuesto federal destinado a salud pública. No se conocen con precisión todas las variables que se encuentran relacionadas con el comienzo de la obesidad debido a su origen multifactorial; sin embargo el contenido de grasa corporal es influenciado por cambios en la dieta preferentemente al consumir alimentos ricos en energía con alto contenido de grasas saturadas y azúcares simples, este tipo de alimentación se sabe que produce daños en el hipocampo que conllevan a una pérdida cognitiva.

Dentro de los elementos que regulan la ingesta de alimentos se encuentra la serotonina, para la cual se ha observado que cambios en la concentración de la misma o una disminución en los niveles de expresión de cierto tipo de receptores serotoninérgicos, se relacionan con un incremento en el anhelo por dulces y carbohidratos además de propiciar un aumento en el peso corporal (Lam *et al.*, 2008). La biosíntesis de la serotonina comienza a partir del aminoácido esencial L-triptófano, lo cual aumenta la concentración plasmática de serotonina. La utilización de agonistas específicos para ciertos receptores, inhibidores de la recaptura de la amina, entre otros fármacos relacionados con el sistema serotoninérgico, al ser utilizados producen una pérdida de peso; pues éstos optimizan el poder de saciedad de la comida después de ser ingerida y otorgan una mejor calidad de vida a las personas obesas.

Entre los diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos, los más estudiados por sus cualidades como inductores de la saciedad, se encuentran el 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. Sin embargo aún se desconoce si la obesidad produce cambios en la expresión de los receptores

5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo. Se ha reportado una similitud entre los receptores 5-HT<sub>5A</sub> y los receptores 5-HT<sub>1D</sub> (Rees *et al.*, 1994), conduciendo a la especulación de que algunas de las acciones atribuidas a estos receptores 5-HT<sub>1D</sub> (es decir, control motor, ansiedad, comportamiento de alimentación) en realidad podría involucrar a los receptores de 5-HT<sub>5A</sub>.

Por los motivos anteriores, en este estudio se caracterizó la distribución de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas con obesidad inducida por dieta y suplementada con triptófano; ayudando así a conocer la implicación de la serotonina en el desarrollo y evolución de la obesidad, para posteriormente realizar estudios a partir de los cuales se les pueda considerar como un blanco terapéutico y desarrollar medicamentos para el tratamiento de la obesidad.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Obesidad

La obesidad es caracterizada por una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2014), convirtiéndose así en el principal desorden de nutrición del planeta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un criterio simple de selección para determinar si un individuo es obeso y en caso de que lo sea, en qué grado de obesidad se encuentra, mediante el índice de masa corporal (IMC), el cual se calcula como el peso (kg) dividido entre la altura al cuadrado ( $m^2$ ) del sujeto en cuestión. El individuo con un IMC de 25 a 29.9  $kg/m^2$  es considerado con sobrepeso, mientras que el que obtiene un IMC  $\geq 30 kg/m^2$  es obeso. La obesidad puede ser además dividida en tipo I (30-34.9  $kg/m^2$ ), tipo II (35-39.9  $kg/m^2$ ) y tipo III o también conocida como obesidad mórbida ( $\geq 39.9 kg/m^2$ ) (Barquera *et al.*, 2009).

Los índices de prevalencia en obesidad han incrementado mundialmente de forma dramática en los últimos años, actualmente poseen sobrepeso y/u obesidad más del 70% de los adultos y 26% de los niños (Villalobos-Comparán *et al.*, 2012). Los mayores incrementos en obesidad desde 1980 se han observado en los países que se encuentran en vías de desarrollo, ya sea con ingresos bajos o medios, particularmente en las regiones urbanas de África del Norte, Latino América y Oceanía (Ahima, 2011).

La comunidad científica ha aunado esfuerzos por investigar a fondo la obesidad ya que se ha comprobado su relación con una variedad de enfermedades de índole crónica degenerativa incluyendo diabetes, hipertensión, enfermedades cardíacas, además se vincula con múltiples enfermedades digestivas, (el reflujo gastroesofágico y sus complicaciones como la esofagitis erosiva, esófago de Barrett's y adenocarcinoma esofágico), pólipos colorrectales, cáncer, enfermedades

del hígado (hígado graso no-alcohólico, cirrosis y carcinoma hepatocelular) dentro de las condiciones comórbidas se encuentran: apnea del sueño, osteoartritis, hipertensión idiopática intracraneal, estasis venosa de extremidades inferiores, incontinencia urinaria ocasionada por estrés, dificultad respiratoria, problemas crónicos musculoesqueléticos, lumbago, problemas en la piel e infertilidad (Das, 2010; Kanasaki y Koya, 2011; Nguyen y El-Serag, 2010).

Los inconvenientes ocasionados por la obesidad conllevan a un deterioro en la calidad de vida de los pacientes obesos y un aumento en la incidencia de la mortalidad ya que la mayoría de las complicaciones, se encuentran dentro de las primeras causas de muerte a nivel mundial (Herrera *et al.*, 2011). La obesidad se considera además como una condición sistémica inflamatoria en bajo grado, es decir, es común encontrar las concentraciones de perilipinas, proteína C-reactiva, TNF- $\alpha$  e interleucina-6 incrementadas, ejerciendo una acción proinflamatoria proveyendo las condiciones requeridas para desarrollar diabetes de tipo II (Das, 2010), encontrándose así las patologías íntimamente relacionadas.

En México el sobrepeso y obesidad son un grave problema de salud pública afectan cerca del 71% de la población adulta mayor de 20 años (mujeres 73%, hombres 69.4%). La prevalencia de la suma del sobrepeso y obesidad en los adultos mexicanos aumentó de 34.5% en 1988 a 61% en 1999 y a 69.3% en el 2006. Datos arrojados por la ENSANUT en el año 2012 describieron que alrededor de 38.5% de la población mayor de 20 años (mujeres 42.6%, hombres 34.5%) tienen obesidad (Gutiérrez *et al.*, 2012), lo cual representó un gasto al país cercano a los 67,345 millones de pesos en el año 2008, con una proyección para el año 2017 de 150,860 millones de pesos, prácticamente se duplicará el gasto realizado en el año 2008 (Barquera *et al.*, 2009).

La obesidad es un problema que no solo perturba a la población adulta; si bien es cierto que el mayor índice se encuentra en esta etapa de la vida, cabe resaltar que en todas las demás etapas incrementa día con día. Se estima en el

mundo cerca de 22 millones de niños menores de 5 años que sufren de sobrepeso u obesidad infantil. En México los datos otorgados por la ENSANUT, revelan que la prevalencia de sobrepeso y obesidad fue de 5.5% en niños menores de 5 años, 18.6% para los escolares y del 21.6% en los adolescentes (López-Alarcón y Rodríguez-Cruz, 2008). Para el año 2012 los infantes en edad escolar (de 5 a 11 años) el 17.4% de los niños y 11.8% de las niñas tenían obesidad; en cambio para los adolescentes entre 12 a 19 años de edad el 14.5% de los hombres y el 12.1% de las mujeres tenían obesidad (Gutiérrez *et al.*, 2012).

La interacción familiar es un factor que posee una estrecha relación en el origen de las enfermedades, incluso en aquellas donde la patología es claramente biológica. Por tal motivo los niños en edad escolar son considerados los miembros más vulnerables a la influencia de un ambiente familiar “obesogénico” y del medio social extrafamiliar, ubicándose éste alrededor de la escuela donde se presenta el mayor consumo de productos con escaso valor nutricional (González –Rico *et al.*, 2012), debido a la facilidad, rapidez y bajo costo con el que se pueden conseguir estos productos alimenticios.

La OMS, la Organización Panamericana de la Salud y diversos gobiernos, reconocen como prioritario prevenir y tratar el problema de la obesidad por todas las complicaciones que conlleva. Parte de los esfuerzos se han concentrado en identificar la naturaleza que origina la obesidad, sin embargo son poco conocidos todos los elementos que influyen para su desarrollo; la patología se debe a una compleja interacción entre diversos elementos conformados principalmente por el ambiente, la predisposición genética y el comportamiento humano (Nguyen y El-Serag, 2010), por lo que la obesidad es considerada como una compleja patología de arquetipo multifactorial.

Este ambiente, predisposición genética y comportamiento humano dan como resultado un balance positivo de energía o un consumo alimenticio que excede las necesidades fisiológicas. Las diferencias entre el balance de energía están

preponderantemente determinadas por el estilo de vida contemporáneo incluyendo el múltiple y continuo consumo de alimentos y comidas hipercalóricas, el desplazamiento en vehículos de motor, mirar la televisión, entre otras actividades que conforman el muy conocido estilo de vida sedentaria (Carr *et al.*, 2011).

Los factores genéticos se encuentran involucrados en el desarrollo de la obesidad aproximadamente entre un 30% a 40% (López-Alarcón y Rodríguez-Cruz, 2008). Los genes candidatos a los cuales se les ha detectado relación al prescindir de ellos o por mutaciones; se pueden dividir en cuatro grupos: 1) Genes que regulan la ingesta: leptina, receptor de leptina y receptor dopaminérgico de tipo 2, el receptor 4 de melanocortina y la pro-opiomelanocortina, 2) Genes que regulan el gasto energético: Proteínas desacoplantes 1 y 2, receptor beta adrenérgico 3, 3) Genes de adipogénesis: el receptor gamma activado por proliferadores de peroxisoma, grelina, factor de necrosis tumoral y el receptor beta- 2 adrenérgico, 4) Otros: receptor de proteínas de baja densidad y el gen asociado a la masa grasa y la obesidad (FTO).

Estadísticamente se ha observado que la incidencia de algunos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) coinciden con la presencia de la obesidad para los genes: transportador ATP vinculante cassette, receptor  $\beta$ 3 adrenérgico, receptor de leptina, propiomelanocortina, receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma, monoamino oxidasa A y neuropéptido Y, (López-Alarcón y Rodríguez-Cruz, 2008).

El gen FTO codifica la proteína 2-oxoglutarato demetilasa dependiente de ácido nucleico, que está implicada en la demetilación o reparación del ácido desoxirribonucleico. Su función "*in vivo*" es todavía desconocida (Herrera *et al.*, 2011), sin embargo su expresión se encuentra relacionada con la obesidad. Villalobos-Comparán *et al.* en el año 2008 determinaron la presencia del gen FTO en la población mestiza mexicana y algunos SNP asociados (rs9939609, rs1421085, rs17817449) encontrándose relación particularmente con la obesidad

de clase III (Villalobos-Comparán *et al.*, 2008). El polimorfismo R230C del gen ABCA1 se ha asociado a la obesidad en poblaciones amerindias (López-Alarcón y Rodríguez-Cruz; 2008), proponiendo una mayor susceptibilidad para algunos grupos étnicos.

Las interacciones sociales son un elemento predisponente para elevar el riesgo de una persona a ser obesa; si se tiene un amigo obeso, el riesgo es de 57%, si es su hermano 40% y si es su cónyuge 37% (Nguyen y El-Serag, 2010).

Un factor más de propensión son los cambios globales en las prácticas de agricultura, procesamiento de alimentos (con altas cantidades de grasas saturadas, azúcares simples, sal, conservadores), el proceso de mercadeo, distribución, transporte entre otros aspectos del planeamiento urbano, han incrementado el aumento en el consumo de comida rápida, comida preparada fuera de casa y disminuido el tiempo de preparación de alimentos, conformando este llamado “ambiente obesogénico” (Ahima, 2011), que se ha relacionado como causante de la epidemia de obesidad.

Dentro de las acciones emprendidas por los organismos gubernamentales para combatir la obesidad, como las llevadas a cabo por la Secretaría de Salud en México se encuentran: fomentar la actividad física en la población, aumentar la accesibilidad al agua potable, disminuir el consumo de azúcar y grasas en bebidas, incrementar el consumo diario de frutas, verduras, leguminosas, cereales de granos enteros y fibra en la dieta, mejorar la capacidad de toma de decisión sobre una dieta correcta y el tamaño de las porciones, disminuir el consumo de azúcares y otros edulcorantes calóricos añadidos en los alimentos y disminuir el consumo de sodio (Barquera *et al.*, 2009).

Son además pasos lógicos para prevenir y tratar la obesidad, la dieta, el ejercicio y otras modificaciones saludables en el estilo de vida, complementado el tratamiento con la toma de fármacos anti-obesidad. Desgraciadamente la

experiencia común dice que es más sencillo ganar peso que perderlo; los fármacos anti-obesidad a la larga son inefectivos, inclusive la cirugía bariátrica es seguida por un incremento de peso en el periodo de recuperación e inclusive se puede llegar a ganar el peso perdido con la reincidencia.

## 2.2 Dieta occidental

La evolución, actuando a través de la selección natural, representa la interacción entre el genoma de las especies y su ambiente durante el transcurso de múltiples generaciones. La humanidad al comienzo de sus días, tuvo que adaptarse a las difíciles y cambiantes condiciones ambientales donde la mayor parte del tiempo era destinado a actividades como la recolección de plantas y la caza de animales, alimentos que eran mínimamente procesados al momento de ser engullidos. Por lo que saciar el hambre fue la principal actividad a ejercer por el hombre primitivo

Con la invención de la agricultura y la ganadería, la sociedad gozó de mayor tiempo para crear tecnología que le facilitaría la obtención de alimentos. El procesamiento de los alimentos fue desarrollado particularmente durante la revolución industrial, permitiendo la combinación de nutrientes y una comida cuantitativa y cualitativa, que antiguamente no se encontraba en el curso de evolución de los homínidos (Cordain *et al.*, 2005).

Los humanos contemporáneos están genéticamente adaptados al ambiente de sus ancestros; sin embargo los productos diarios como cereales, azúcares refinados, aceites vegetales refinados y alcohol conforman cerca del 72.1% de la energía total consumida por las sociedades occidentales. Este tipo de alimentos procesados (por ejemplo: galletas, pasteles, panadería, cereales para el desayuno, muffins, papas, botanas, pizza, refrescos, dulces, helados, condimentos y aderezos de ensaladas) dominan la típica dieta occidental, alterando de esta forma las 7

características nutrimentales de una dieta ancestral homínida: 1) carga glicémica, 2) composición de los ácidos grasos, 3) composición de macronutrientes, 4) densidad de micronutrientes, 5) balance ácido-base, 6) relación sodio-potasio y 7) contenido de fibra.

La colisión de nuestro genoma antiguo con las cualidades nutrimentales que recientemente se han introducido en los alimentos procesados, podrían ser la razón de la existencia de muchas de las enfermedades crónicas en la sociedad Occidental (Cordain *et al.*, 2005).

### 2.3 Hambre y saciedad

Las condiciones implicadas en la ingesta de alimentos, requieren la regulación del balance de energía, siendo este un proceso complejo que incluye la integración de señales externas, periféricas y centrales. El cerebro es el núcleo de integración de las señales homeostáticas y no homeostáticas (Cornier, 2011). Las señales le indican al individuo el momento preciso en el cual se requiere consumir alimentos. En última instancia, la decisión de iniciar la ingesta de alimentos, la cantidad a consumir y cuándo terminar la comida se ve afectada no sólo por los mecanismos homeostáticos, sino también por comportamientos aprendidos, factores cognitivos, hábitos, contexto social, disponibilidad de la comida y señales sensoriales externas como la entrada visual, el olor, el color y el gusto (Minor *et al.*, 2009).

Es necesario diferenciar entre la necesidad de consumir alimentos y el deseo de consumir alimentos. Se conoce como hambre a esas sensaciones que promueven la consecución de las necesidades mínimas de energía (Mattes, 2010), dentro de estas sensaciones se pueden encontrar las relacionadas directamente con el estómago (por ejemplo, gruñidos, dolores) o la cabeza (dolor de cabeza, mareo, vértigo, pérdida de la concentración), sensaciones más generalizadas (por

ejemplo, debilidad, ansiedad, náusea) y atribuciones a otros sistemas sensoriales relacionados al balance de los fluidos (por ejemplo, sed, sequedad en la boca, salivación). En cambio el apetito abarca el deseo de comer y el disfrute de ciertos alimentos ya sea por expectativas sociales o la esperada estimulación sensorial (Sanger *et al.*, 2010).

En el tracto gastrointestinal, hipotálamo y tejido adiposo se generan moléculas que dan respuesta final en la forma de saciedad o hambre; el consumo de alimentos depende del balance entre este estímulo regulatorio. La red de moléculas reguladoras del apetito es sumamente compleja, se han realizado ensayos donde se manipula la alimentación, ayuno e infusión de hormonas, para observar el efecto de los anorexigénicos y orexigénicos (Kumar *et al.*, 2008).

### 2.3.1 Moléculas orexigénicas y anorexigénicas

Las moléculas orexigénicas incrementan su concentración en plasma antes de las comidas, su aumento inicia el consumo de alimentos y su concentración declina después de la comida. Las anorexigénicas incrementan su concentración siguiente al inicio de la comida y pueden terminar la ingesta de alimentos o regular los intervalos entre comidas (Tabla 1) (Gibson *et al.*, 2010).

Como ejemplos de péptidos orexigénicos se cuenta con: péptido relacionado agouti (AgRP), endocannabinoides, galanina, grelina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, hormona concentradora de melanina, neuropéptido Y (NPY) y péptidos opioides ( $\beta$ -endorfina). Como anorexigénicos: hormona estimulante  $\alpha$ -melanocortina, amilina, péptido del gen relacionado de la calcitonina, colecistoquinina, transcripto regulado por cocaína y anfetamina (CART), proopiomelanocortina (POMC) hormona liberadora de corticotropina, glucagón, péptidos tipo glucagón 1 y 2, insulina, leptina, neuromedina U, neurotensina,

oxintomodulina, polipéptido pancreático, péptido YY, urocortina y serotonina (Cooke y Bloom, 2006; Gibson *et al.*, 2010).

Tabla 1. Ejemplos de moléculas reguladoras del apetito. Modificado (Gibson *et al.*, 2010)

Orexigénicos	Anorexigénicos	Regulación entre comidas (Anorexigénicos)
Grelina	Colecistoquinina	Péptido similar al glucagón 1
NPY	Serotonina	Péptido YY <sub>3-36</sub>
Proteína agouti	Oxintomodulina	Leptina
Endocannabinoides	Amilina	Insulina

Los anorexigénicos y orexigénicos controlan la homeostasis de la ingesta de alimentos mediante el circuito descrito como intestino-cerebro, donde el intestino genera señales de hambre o saciedad secundarias a cambios en el estímulo mecánico y nutricional; esta señal viaja a lo largo del nervio vago, para llegar al tronco cerebral y luego al hipotálamo donde se integran y procesan las señales.

#### 2.4 El cerebro como centro del control del consumo de alimentos

Existen dos mecanismos neurobiológicos que gobiernan el consumo de alimentos: uno controla la necesidad de comer y el otro el deseo de comer. Las señales periféricas como la hormona relacionada con adiposidad, leptina, péptidos derivados de alimentos, nutrientes y distensión del estómago, todas ellas son la clave fisiológica u homeostática. Señales cerebrales superiores que abarcan desde las cognitivas, emocionales, motivacionales y vías de recompensa son también centrales en la regulación del balance de energía (Cornier, 2011). Finalmente, señales externas ambientales relacionadas con los alimentos, contexto social,

tiempo de las señales, etcétera son críticas en la última regulación del balance de energía. Por lo que se ha observado que para poder integrar las señales primitivas de alimentación y las funciones superiores; múltiples regiones cerebrales se encuentran implicadas en la regulación del consumo de alimentos, señalando el hipotálamo, tronco encefálico y mesencéfalo.

El hipotálamo es una pequeña área del cerebro localizada justo debajo del tálamo, es el centro regulador del apetito y homeostasis de la energía. El hipotálamo contiene varios núcleos de interconexión: el núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), área lateral hipotalámica (LHA), núcleo ventromedial (VMN), y el núcleo dorsomedial (DMN). El ARC es considerado el área hipotalámica primaria que censa las señales metabólicas. En el ARC existen dos tipos distintos de poblaciones neuronales: el primero es un grupo de neuronas que coexpresan neuropéptidos orexigénicos, incluyendo NPY y AgRP, el otro subconjunto de neuronas expresan neuropéptidos anorexigénicos incluyendo POMC y CART. Estas neuronas son de primer orden donde las señales periféricas metabólicas incluyendo leptina, insulina, grelina y nutrientes son transferidas principalmente. La monoamina anorexigénica serotonina, también actúa en las neuronas POMC mediante el receptor 5-HT<sub>2C</sub> para inducir anorexia. Las neuronas POMC envían proyecciones axonales a neuronas de segundo orden en otras áreas hipotalámicas, PVN, VMN y LHA (Kim *et al.*, 2011; Yu y Kim, 2012).

El tronco encefálico es otra área del cerebro involucrada en el consumo de alimentos y el balance de energía. Las señales de saciedad del tracto gastrointestinal principalmente relacionadas al núcleo del tracto solitario (NTS) a través del nervio sensorial vago, propician una mayor unión neuronal entre el intestino y el cerebro. Transmisiones de fibras vagales sensoriales resultan en un incremento del tamaño y duración de la comida, confirmando que las señales vagales aferentes transfieren señales de saciedad en el cerebro (Schwartz, 2000). El NTS está localizado en un sitio perfecto para recibir ambas señales humorales y neurales. Mientras tanto, el NTS recibe extensivas proyecciones neuronales de

PVN y viceversa, indicando que existe una íntima comunicación entre el hipotálamo y el tronco encefálico. Similarmente a las neuronas hipotalámicas, las neuronas NTS producen el péptido relacionado a glucagón 1, NPY, y POMC, además censan señales periféricas metabólicas. Por ejemplo las neuronas POMC en el NTS muestran señal de transducción activada del transcriptor 3 (STAT3) en respuesta a leptina (Ellacott *et al.*, 2006). Por lo tanto las hormonas circulantes y nutrientes pueden informar señales metabólicas al cerebro actuando en el hipotálamo y el tronco encefálico (Yu y Kim, 2012).

El mesencéfalo está relacionado con el sistema de recompensa involucrado en el control de la alimentación hedónica, por ejemplo el consumo de alimentos palatables o agradables. Como en otros comportamientos de adicción, las vías mesolímbicas y mesocorticales dopaminérgicas están involucradas en la alimentación hedónica. El consumo de comidas palatables ejerce una liberación de dopamina en el área ventral tegmental (VTA), que en cambio activa las vías neuronales de VTA al núcleo accumbens vía el haz medial del cerebro anterior, donde la alimentación hedónica es modulada por señales metabólicas como la leptina (Yu y Kim, 2012).

Recientemente ha sido posible examinar la respuesta humana del cerebro a señales relacionadas con comida utilizando técnicas de neuroimagen, permitiendo comprender mejor las complejas vías y redes neuronales y cómo es que ellas se relacionan en el consumo de alimentos. Usando una Tomografía de Emisión de Positrones, se examinó el flujo de sangre regional cerebral en respuesta al consumo y sabor de la comida en individuos con peso normal, obesos e individuos con obesidad-reducida (DelParigi *et al.*, 2004). En contraste con los individuos control, se encontró que ambos grupos obesos y con obesidad-reducida tienen un incremento similar en la actividad en respuesta del sabor en la ínsula, región cerebral importante para la percepción y control de aspectos complejos del comportamiento en la alimentación incluyendo anticipación y recompensa. En respuesta a la comida (saciedad) ambos obesos e individuos con obesidad-

reducida tienen reducciones de actividad en el hipocampo posterior comparado con individuos controles. Los autores concluyeron que la similitud “anormal” de las respuestas neuronales a la comida en obesos e individuos con obesidad-reducida sugieren la predisposición que la obesidad puede implicar en regiones cerebrales que son importantes para el comportamiento en la alimentación.

Estudios recientes han resaltado la posibilidad de que diferentes estructuras del encéfalo a las clásicamente relacionadas en el control de la ingesta de alimentos sean consideradas como reguladoras de la función biológicas, un claro ejemplo se puede observar en el hipocampo donde se señala la posibilidad que el aprendizaje y memoria dependientes de él, pudieran estar relacionadas con la ingesta de alimentos (Davidson *et al.*, 2007).

#### 2.4.1 El hipocampo y la obesidad

El hipocampo es una pequeña estructura situada dentro del lóbulo temporal intermedio del cerebro humano y comprende una parte importante del sistema límbico, la región encargada de regular las emociones. El hipocampo se asocia principalmente a la memoria, particularmente a la memoria de largo plazo, también desempeña un papel importante en la navegación espacial. Cualquier daño puede llevar a la baja de la memoria.

Giulio Cesare Aranzio (1530-1589), propuso el término *hippocampus* para referirse a la región medial del lóbulo temporal dada su semejanza con un caballito de mar (Iniasta, 2012). Las regiones neuronales que conforman al hipocampo, se encuentran conformadas por capas moleculares (fibras nerviosas y neuronas diseminadas), piramidales (neuronas piramidales), polimorfa y granular. Las partes que conforman el hipocampo se dividen en giro dentado (DG, capa celular curvada densamente empaquetada con células granulares), cuernos de Amón (CA) que pueden ir desde 1 al 4, compuestos principalmente de neuronas piramidales (Kandel, 2005). El nombre CA fue asignado por los anatomistas franceses de la

ilustración quienes acuñaron el término *Cornu Ammonis* o asta de Amón para referirse a esta oculta y retorcida estructura anatómica debido a su similitud mórfica con las astas de carnero presentes en la cabeza del dios egipcio Amón (Inieta, 2012).

El sobrepeso ha mostrado estar asociado con daños neuronales en el hipocampo de adultos jóvenes, Mueller *et al.*, sometieron a resonancia magnética nuclear a sujetos con sobrepeso, obesidad y peso normal de entre 20 a 41 años, en los cuales se observó que entre más índice de cintura cadera se tenga (individuos con sobrepeso u obesidad), el parámetro se correlaciona negativamente con el volumen del hipocampo sugiriendo un daño neuronal (Mueller *et al.*, 2012).

Los daños neuronales se presentan en múltiples formas, ya sea como una disminución de la neurogénesis donde la dieta puede jugar un papel fundamental; por ejemplo al otorgarse una dieta alta en grasas (HF, 42% de la energía calórica total) a ratas Sprague Dawley machos y hembras durante 4 semanas y cuantificar el cambio en la tasa de proliferación neuronal mediante el ensayo de bromoderoxiuridina o Brdu, no se observaron diferencias significativas en el peso corporal con respecto a grupos control para cada sexo, ni un aumento significativo en la acumulación de grasa corporal; para los machos con la dieta HF, se encontró una disminución aproximadamente del 40% con respecto al control en la neurogénesis del giro dentado y hasta un incremento 3 veces mayor con respecto al grupo control en los niveles de corticosterona; sugiriendo que la corticosterona producida por el estrés inhibe la neurogénesis en el hipocampo, este efecto no se observó en las hembras probablemente debido a la presencia de estrógenos que promueven la neurogénesis mediante la estimulación del factor de crecimiento tipo insulina (Lindqvist *et al.*, 2006). Esto fue confirmado por estudios realizados en macacos adultos, cuyas madres fueron sometidas a una demanda de forrajeo variable y se midió la tasa de proliferación con el marcador mitótico doblecortina o DCX encontrando una correlación negativa entre el peso corporal y las células marcadas con DCX (Perera *et al.*, 2011).

Los factores ambientales como la alimentación materna, alteran el desarrollo hipocampal de los fetos; en ratones hembras C57BL/6 expuestas a dieta HF al 60% durante 10 semanas fueron posteriormente fecundadas, se les removieron los fetos a los 17 días de gestados, encontrándose una reabsorción de fetos al 10% con respecto a la dieta control, sin embargo lo más interesante que se observó fue que las células mitóticas en el DG disminuyeron significativamente en los fetos expuestos a dieta HF, la maduración neuronal en DG disminuyó un 75% y para CA y fimbria la apoptosis disminuyó un 80%. Cabe resaltar que durante el desarrollo neuronal del feto la apoptosis es un proceso fundamental que permite la selección de las células apropiadas antes de completar su diferenciación en la vida postnatal, las disminuciones en apoptosis del hipocampo durante la etapa fetal pueden ser interpretadas como un retraso constitutivo en el desarrollo (Niculescu y Lupu, 2009).

No se originan únicamente cambios en la apoptosis y neurogénesis hipocampal, se han observado además modificaciones en la funcionalidad. Las ratas Zucker son *knock out* para el receptor a leptina y el genotipo homocigoto exhibe obesidad espontánea; las ratas homocigotas comparadas contra las heterocigotas, reportaron mediante ensayos electrofisiológicos daños en la potenciación a largo plazo en CA1, pero no en DG; observándose además para CA1 mediante *western blot* una disminución en la fosforilación de la CaMKII, involucrada en la señalización celular mediadora del aprendizaje y la memoria aunado a una disminución de la disponibilidad de CaMKII; mientras que en el DG de igual forma se observó una disminución de la disponibilidad de CaMKII, sin embargo aumentó la proporción de P-CaMKII (Alzoubi *et al.*, 2005), como consecuencia el modelo biológico presentó deficiencias cognitivas y deterioro en la memoria (Winocur *et al.*, 2005).

#### 2.4.1.1 Hipocampo y dietas altas en energía

Dentro de los elementos que componen las dietas occidentales altas en energía, las grasas saturadas se han asociado con un incremento en la incidencia de la enfermedad de Alzheimer y con otras formas leves de disfunción cognitiva (Berrino, 2002; Pasinetti y Eberstein, 2008; Eskelinen *et al.*, 2008). El consumo de carbohidratos simples (mono y disacáridos) ha estado relacionado con daños en el desempeño cognitivo en contraste a dietas compuestas de carbohidratos complejos en adultos y niños (Papanikolaou *et al.*, 2006; Benton *et al.*, 2007).

Daños en la memoria y aprendizaje han sido demostrados en roedores de laboratorio seguidos al consumo de dietas altas en grasas saturadas, altas en carbohidratos simples o en la combinación de ambos mediante una dieta alta en energía. Las ratas al ser sometidas a un tratamiento con dieta alta en energía durante las pruebas de aprendizaje muestran una disminución en la capacidad para poder discriminar objetos (Kanoski *et al.*, 2007; Kanoski *et al.*, 2010). En el laberinto acuático de Morris, prueba estándar para observar daños confinados a la región hipocampal, también acontecen perturbaciones en el aprendizaje y memoria al ingerir altos niveles de ácidos grasos saturados y sacarosa (Stranahan *et al.*, 2008).

La evidencia acumulada sugiere que: a) el consumo de una dieta occidental interfiere con el funcionamiento hipocampal, b) la interferencia con el funcionamiento hipocampal puede dañar la memoria de inhibición en conjunto con otras funciones cognitivas y, c) daños en la memoria de inhibición pueden promover la elicitación del comportamiento apetitivo por señales ambientales relacionadas con comida (Kanoski y Davidson, 2011) llevando a un “ciclo vicioso” en el que la alimentación continua lleva a un mayor daño en la función de la memoria dependiente de hipocampo que posteriormente debilitará la habilidad de inhibir el consumo de dietas occidentales que promueven la disfunción hipocampal en primer lugar.

## 2.5 Neurotransmisores

En el cerebro la comunicación celular regula los complicados procesos de aprendizaje, memoria, control del consumo de alimentos entre otros, a través de un amplio repertorio de moléculas señalizadoras como: a) hormonas y citosinas, b) moléculas de adherencia y componentes de la matriz extracelular y c) neurotransmisores, pueden inducir una cascada de reacciones intracelulares, que regulan en gran medida los diferentes aspectos del comportamiento celular, incluyendo su metabolismo, motilidad, proliferación, supervivencia y proliferación (Cooper y Hausman, 2002).

Las neuronas son las células encargadas de realizar la comunicación sináptica. Su morfología con extraordinarias formas complejas y extensivas ramas, permite que cada neurona se conecte a sus vecinas mediante uniones protoplásmicas formando una intrincada red neuronal (Purves *et al.*, 2004). Cada neurona consiste en un cuerpo celular, con un número de delgados procesos que radian hacia el exterior, usualmente un axón lleva las señales lejos del núcleo celular a las células objetivo y varias ramas cortas llamadas dendritas se extienden del cuerpo celular proporcionando un área más amplia para recibir señales de axones de otras neuronas (Alberts *et al.*, 2008).

Al llegar el impulso nervioso al extremo del axón, este se transmite por un mecanismo que puede ser eléctrico o químico. En el caso del mecanismo eléctrico, simplemente la despolarización pasa el impulso de una célula a otra; en otros casos, es gracias a la sinapsis que libera sustancias químicas específicas, que varían de unas neuronas a otras en las distintas regiones del sistema nervioso, y que por su papel reciben el nombre de neurotransmisores. El neurotransmisor al ser liberado en el espacio intersináptico funge una acción señalizadora que captan los receptores específicos postsinápticos, mismos que darán lugar a una respuesta como la generación o el relevo de un nuevo impulso nervioso (Peña, 2010).

El gran número de agentes conocidos como neurotransmisores (100 diferentes) permiten una tremenda diversidad de señales químicas entre las neuronas (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de los principales neurotransmisores

<b>Tipo</b>	<b>Neurotransmisor</b>	<b>Ejemplo de función</b>
<i>Excitatorios</i>	Acetilcolina	Facilita la transmisión de impulsos nerviosos a través de la sinapsis
	Adrenalina, noradrenalina	Excita el cerebro y lo mantiene alerta
	Serotonina	Regulación de la temperatura, percepción sensorial, inicio del sueño, control del apetito
	Dopamina	Control motriz, control del apetito
<i>Inhibitorios</i>	Ácido gamma-aminobutírico (GABA)	Coordinación motriz a través de la inhibición de ciertas neuronas
	Glicina	Inhibe la transmisión a lo largo de ciertos haces de la médula espinal
<i>Neuropéptidos (aminoácidos de cadena corta)</i>	Encefalinas, endorfinas	Bloquean la transmisión y la percepción del dolor
	Sustancia P	Impulsos del dolor

Es útil clasificar a los neurotransmisores en dos categorías dependiendo de su tamaño. Los neuropéptidos son moléculas compuestas de 3 a 36 aminoácidos; mientras que los neurotransmisores de una sola molécula son aminoácidos individuales como el glutamato, GABA, acetilcolina, serotonina, histamina, dopamina, norepinefrina, epinefrina. Las particularidades de síntesis, empaquetamiento, liberación y eliminación difieren para cada neurotransmisor (Purves *et al.*, 2004). Una única neurona puede ser capaz de utilizar diferentes transmisores en la misma sinapsis (Kolb y Whishaw, 2009).

## 2.6 Receptores

Cuando un neurotransmisor es liberado durante la sinapsis atraviesa la hendidura sináptica y se une a un receptor. Existen dos clases de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos (Koolman y Röhm, 2004). Los receptores ionotrópicos se componen de un sitio de unión al ligando y un poro o canal, estos receptores pueden ser ligando dependientes o voltaje dependientes, abrir o cerrar el canal iónico cambiando brevemente su permeabilidad y por lo tanto la excitabilidad de la célula postsináptica (Byrne y Roberts, 2004).

Los receptores ionotrópicos se relacionan con una rápida señal sináptica entre células excitables eléctricamente. En cambio los receptores metabotrópicos, están acoplados a proteínas G como mecanismo efector e influyen a través de ellas en la formación de los segundos mensajeros (Koolman y Röhm, 2004), los cuales provocan en la neurona postsináptica una alteración en el flujo iónico, ya sea por la formación o estimulación para la producción de una nueva proteína (Kolb y Whishaw, 2009).

Los receptores además de localizarse en las neuronas postsinápticas, también se localizan en las neuronas presinápticas donde, modulan la transmisión, liberación o síntesis de neurotransmisores o flujo de impulso y pueden ser considerados como un mecanismo homeostático de retroalimentación (Byrne y Roberts, 2004).

## 2.7 Serotonina

Dentro de los neurotransmisores de clase amina más importantes se encuentra la serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT); molécula integrada por un grupo amino básico separado de un núcleo aromático por una cadena alifática de dos carbonos, el nombre fue asignado al ser identificada por vez primera en el

suero “sero” y al incrementar su concentración se observó una contracción en el tono de los vasos sanguíneos “tonin” (Rapport *et al.*, 1948); al mismo tiempo Vittorio Erspamer, descubría en un extracto acetónico de células enterocromafines localizadas en la mucosa del tracto gastrointestinal una molécula que causaba la contracción del músculo liso del útero, llamándola enteramina (Gershon, 2009). No fue sino hasta el año 1952, cuándo se estableció que la molécula conocida como enteramina era idéntica a la serotonina, revelando así su comportamiento de tipo ubicuo pues actúa como mensajera, así como neurotransmisora y neuromoduladora (Barnes y Sharp, 1999).

La serotonina se encuentra distribuida en plantas y animales; dentro del reino animal se puede encontrar en sistemas neuronales que abarca prácticamente a todos los organismos, desde los más sencillos como la *Drosophila* hasta los más complejos como los humanos (Jonnakuty y Gragnoli, 2008). Esta hormona feliz llamada así por el Dr. Barnes (Barnes, 2011), está involucrada en múltiples procesos biológicos, participa en el desarrollo, con funciones cardiovasculares, gastrointestinales, endocrinas, de percepción sensorial, modifica el comportamiento tal como la agresión, apetito, sexo, sueño, humor, aprendizaje y memoria (Nichols y Nichols, 2008).

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido esencial triptófano, a través de diferentes reacciones enzimáticas. Primeramente el L-triptófano se hidroxila a 5-hidroxi-L-triptófano (5-HTP), por medio de la triptófano hidroxilasa. Esta enzima se puede encontrar en dos isoformas como triptófano hidroxilasa 1 (tejidos periféricos) y triptófano hidroxilasa 2 (cerebro), esta reacción constituye el paso limitante en la síntesis de serotonina. Se requiere oxígeno y tetrahidropteridina para que ocurra la reacción. El 5-HTP es convertido en 5-HT por la enzima L-aminoácido descarboxilasa, que usa como cofactores la vitamina B6, vitamina B3 y el magnesio (Jonnakuty y Gragnoli, 2008).

Cerca del 95% de la serotonina total se localiza en tejidos periféricos, ella es sintetizada y almacenada en las células enterocromafines (Camilleri, 2009), por lo tanto solo una sola pequeña fracción es producida en el cerebro en el núcleo del rafe ya que la 5-HT no puede atravesar barrera hematoencefálica. La serotonina liberada en la circulación sanguínea por las célula enterocromafines, es rápidamente recapturada por las plaquetas vía transportador de serotonina y almacenado en densos gránulos en las plaquetas que constituyen casi toda la serotonina corporal circulante (Jonnakuty y Gragnoli, 2008).

## 2.8 L-triptófano

El L-triptófano (Trp) es un aminoácido esencial que actúa como precursor de la 5-HT, por lo tanto la síntesis y disponibilidad de dicha amina está influenciada por el consumo de Trp. Los cambios en la concentración de Trp contenido en la dieta son utilizados como un método no invasivo para manipular los niveles plasmáticos de Trp y por lo tanto la neurotransmisión central de 5-HT (Noristani *et al.*, 2012).

En el hipocampo puede ser manipulado el nivel de 5-HT extracelular modificando el contenido de Trp en la dieta. Los niveles serotoninérgicos incrementan significativamente cuando ratas Sprague-Dawley macho son expuestas a una dieta alta en triptófano (0.48 g de Trp /100 g de alimento) después de una semana de tratamiento. En cambio una dieta baja en triptófano (10%) otorgada por 4 días disminuye significativamente los niveles de 5-HT (van der Stelt *et al.*, 2004).

Noristani *et al.*, reportaron que un modelo de ratón con Alzheimer (3xTg-AD) sometido a un tratamiento por 40 días con una dieta alta en triptófano (0.40g de Trp /100 g de alimento), no mostraba diferencias significativas en el peso corporal con respecto al grupo control, sin embargo, las dieta alta en triptófano disminuyó la

acumulación de las placas  $\beta$ -amiloides sugiriendo que el incremento de serotonina, puede ser un agente neuroprotector (Noristani *et al.*, 2012).

## 2.4 Receptores a serotonina

La expresión ubicua de los receptores a serotonina en el cuerpo humano contribuye a su función en numerosos sistemas fisiológicos (Barnes y Sharp, 1999). Los primeros ensayos farmacológicos realizados en el intestino diferenciaron dos tipos de respuestas a la 5-HT: la bloqueada por morfina y la bloqueada por dibencilina, así se introdujo la primera clasificación de receptores serotoninérgicos M y D. Actualmente una clasificación diferente es utilizada pues la familia de receptores a serotonina se encuentra ampliamente localizada, se han reportado siete familias de receptores designadas de 5-HT<sub>1-7</sub>, muchas de ellas con subfamilias y todas presentes en el sistema nervioso (Tabla 3) (Barnes y Sharp, 1999; Nichols y Nichols, 2008).

La mayoría de los receptores a serotonina están acoplados a proteínas G, y activan intracelularmente la cascada de segundos mensajeros como: el adenosín monofostato cíclico (cAMP), el diacilglicerol (DAG) y/o el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3); a excepción de los receptores 5-HT<sub>3</sub> que son canales iónicos (Barnes y Sharp, 1999).

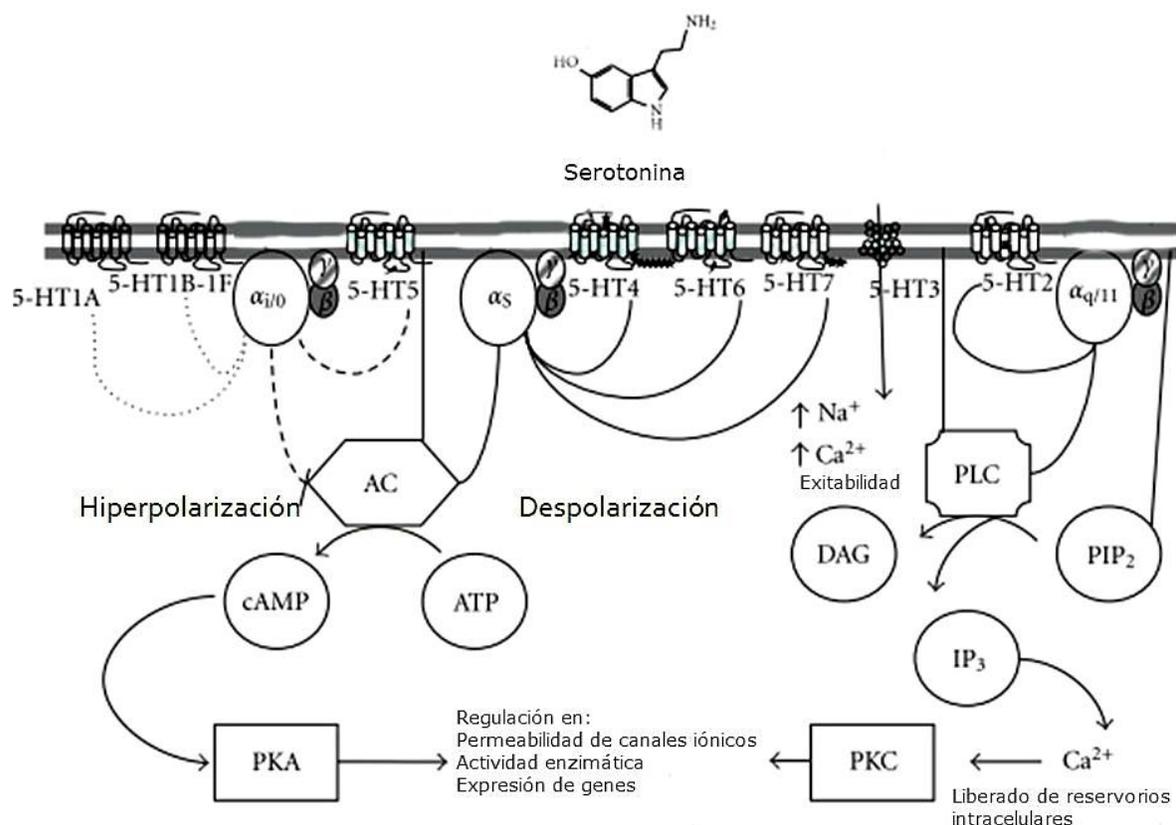
La clasificación los receptores serotoninérgicos, se ha realizado de acuerdo a su estructura, transducción de señal y farmacología (Figura 1). El primer receptor de serotonina en ser clonado y caracterizado fue el 5-HT<sub>1A</sub> (Fargin *et al.*, 1988).

Los receptores serotoninérgicos acoplados a proteínas G (compuesta de 3 subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ), pueden ejercer múltiples efectos en la célula dependiendo de a qué tipo de subunidad  $\alpha$  se encuentren acoplados, ya sea inhibiendo ( $\alpha_{i/o}$ ) o estimulando ( $\alpha_s$ ) a la adenilato ciclasa o activando a la fosfolipasa C ( $\alpha_q$ ). Cabe

resaltar que como muchos otros receptores acoplados a proteínas G, se ha observado que los receptores a serotonina suelen formar homodímeros como en el caso de los receptores 5-HT<sub>2C</sub>. Esta dimerización se observó en células transfectadas de riñón embrionario (línea celular HEK293), sin embargo el significado funcional de la dimerización continúa siendo desconocido (Herrick-Davis *et al.*, 2005).

Tabla 3. Clasificación de la familia de receptores a serotonina. Modificado (Escobar *et al.*, 2006)

Familia	Subtipo	Mecanismo de señalización	Principal localización
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	G <sub>i/o</sub>	Hipocampo, núcleo de rafe
	5-HT <sub>1B</sub>	G <sub>i/o</sub>	Estriado, sustancia negra
	5-HT <sub>1D</sub>	G <sub>i/o</sub>	Vasos sanguíneos craneales
	5-HT <sub>1E</sub>	G <sub>i/o</sub>	Corteza
	5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i/o</sub>	Encéfalo y periferia
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	G <sub>q/11</sub>	Plaquetas, músculo liso, corteza cerebral
	5-HT <sub>2B</sub>	G <sub>q/11</sub>	Fondo gástrico
	5-HT <sub>2C</sub>	G <sub>q/11</sub>	Plexo coroideo, corteza, hipocampo
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3A-E</sub>		Nervios periféricos, tracto intestinal
5-HT <sub>4</sub>		G <sub>s</sub>	Hipocampo, tubo digestivo
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	G <sub>i/o</sub>	Hipocampo
	5-HT <sub>5B</sub>	G <sub>i/o</sub>	Habénula medial e hipocampo
5-HT <sub>6</sub>		G <sub>s</sub>	Cuerpo estriado
5-HT <sub>7</sub>		G <sub>s</sub>	Hipotálamo, intestino



**Figura 1. Principales vías de señalización de la serotonina.** AC, adenilato ciclasa; ATP, adenosín trifosfato; cAMP, adenosín monofosfato cíclico; DAG, diacilglicerol; PIP<sub>2</sub>, fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PLC, fosfolipasa C; IP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C. Modificado (Berumen *et al.*, 2012).

Los receptores se encuentran localizados en múltiples tejidos, principalmente en el cerebro. Dentro de los receptores serotoninérgicos implicados en la mediación de la ingesta de alimentos, se encuentran los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> los cuales mediante su agonismo presentan efectos hipofágicos, mientras que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>6</sub> parece tener un efecto anoréxico (Sargent y Henderson, 2011); alguna variación en su expresión se puede ver relacionada con el desarrollo de enfermedades de tipo nutricional como la anorexia y la obesidad.

## 2.7 Obesidad y receptores a serotonina

Qué, cuándo, porqué y cuánto comer, es un complejo proceso dependiente de la habilidad del cerebro para integrar las señales inhibitorias y excitatorias del organismo. Las señales excitatorias reflejan la necesidad de energía y nutrientes, mientras que las inhibitorias surgen de las señales de saciedad después del consumo de alimentos (Haahr *et al.*, 2012).

El papel de la serotonina en el control del apetito se encuentra bien reconocido, los fármacos serotoninérgicos como la fenfluramina, fluoxetina, sibutramina, m-clorofenilpiperazina, lorcaserina, teofensina y dexfenfluramina por mencionar algunos, reducen el consumo de alimentos en roedores, en una forma consistente con el realce de la saciedad. En humanos, se ha demostrado una reducción en el consumo calórico, un efecto asociado con un hambre reducida y saciedad incrementada con el uso de este tipo de fármacos (Halford y Harrold, 2012). Estudios realizados en animales reportan a los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (Tabla 4) como elementos que influyen la ingesta de alimentos, además se les considera como blancos terapéuticos farmacológicos anti-obesidad (Garfield y Heisler, 2009).

Se realizó una resonancia magnética nuclear a un grupo de humanos utilizando el rastreador [<sup>11</sup>C]SB207145 el receptor 5-HT<sub>4</sub> ubicado en la región del hipocampo izquierdo presentó una relación positiva entre el incremento de su densidad con respecto al IMC (Haahr *et al.*, 2012). Los sistemas centrales serotoninérgicos pueden regular la eficiencia del gasto energético. Para el receptor 5-HT<sub>1A</sub> durante el desarrollo de las ratas Zucker obesas a las cuales se les administró el antagonista 8-OH-DPAT, mostraron diferentes respuestas a la alimentación, indicando la relación de los cambios en el metabolismo cerebral de la 5-HT en las regiones del hipotálamo, el córtex frontal y el córtex parietal (Voigt *et al.*, 2002).

Tabla 4. Receptores serotoninérgicos relacionados con obesidad

Receptor	Tipo de manipulación	Efecto en el consumo de alimentos
5-HT <sub>1A</sub>	Agonismo	Incremento
5-HT <sub>1A</sub>	Antagonismo	Disminución
5-HT <sub>1B</sub>	Agonismo	Disminución
5-HT <sub>2A</sub>	Agonismo	Disminución
5-HT <sub>2C</sub>	Agonismo	Disminución
5-HT <sub>2C</sub>	Antagonismo	Incremento
5-HT <sub>3</sub>	Antagonismo	Incremento
5-HT <sub>4</sub>	Agonismo	Disminución
5-HT <sub>6</sub>	Antagonismo	Disminución

Los fármacos que inhiben la recaptura de serotonina, permiten que permanezca en concentraciones considerables y por un tiempo mayor en el espacio sináptico incrementando la actividad de receptores postsinápticos serotoninérgicos, los cuales causan reducción en el consumo de alimentos durante la comida, cambiando el patrón de alimentación. Sin embargo medicamentos como la fluoxetina y sertralina que disminuyen la ingesta de alimentos, no se encuentran indicados para el tratamiento de la obesidad, debido a su efecto no específico en la reducción de peso; además después de un largo periodo de consumo se observa el fenómeno de recuperación del peso perdido en los pacientes (Feijo Fde *et al.*, 2011).

El sistema serotoninérgico, concomitantemente regula las funciones antagonistas de neuronas POMC/CART y AgRP/NPY, despolarizando neuronas POMC/CART a través de la acción de receptores 5-HT<sub>2C</sub> acoplados a proteína G<sub>q</sub> y la hiperpolarización de neuronas AgRP/NPY mediante la acción de receptores 5-HT<sub>1B</sub> acoplados a proteína G<sub>i</sub>. Es de notar que compuestos agonistas serotoninérgicos son muy eficaces en la reducción de la ingesta de alimentos y se vuelven ineficaces por la inactivación farmacológica o genética de un único objetivo río abajo del receptor de melanocortina. Estos datos dilucidan que la vía de la melanocortina, es un objetivo clave para el control de la hipofagia serotoninérgica (Garfield y Heisler, 2009).

El receptor serotoninérgico que más se ha relacionado con la obesidad, debido a la cantidad de información con la que se cuenta es el subtipo 5-HT<sub>2C</sub>. Los modelos de ratones *knockout* a los cuales se les indujo una mutación del gen HTR2C para el receptor a serotonina 5-HT<sub>2C</sub>, presentaron hiperfagia y consumieron comidas más largas, indicando un déficit en la saciedad; estos rasgos contribuyen a un incremento de la masa corporal (Tecott, 2007). Ratones con obesidad inducida por dieta y ratones *knockout* ob/ob para el receptor de leptina B6.V-Lep<sup>ob</sup>/J (exhiben obesidad y poseen niveles elevados de glucosa e insulina en el ayuno comparado con los ratones silvestres), a los ratones obesos se les administró durante 14 días el agonista clásico para receptores 5-HT<sub>2C</sub> m-clorofenilpiperazina observándose una mejoría en la homeostasis de glucosa e insulina en los animales expuestos a la dieta y en los mutantes, sin afectar la ingesta de alimentos a través de un mecanismo dependiente del receptor a melanocortina 4. (Zhou *et al.*, 2007). El fármaco lorcaserina es un agonista selectivo de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> debido a su mayor afinidad con respecto a los receptores 5-HT<sub>2B</sub> la lorcaserina inhibe el desarrollo de la obesidad inducida por dieta un año de tratamiento en humanos logra disminuir hasta 5.8 kg de peso corporal (Halford y Harrold, 2012). Los receptores 5-HT<sub>6</sub> en ratones deficientes del receptor muestran una sensibilidad reducida a la obesidad inducida por la dieta; esto puede deberse a que los dos

subtipos de receptores, pueden tener roles opuestos, al mediar la función de la serotonina en la señalización de la alimentación (Frassetto *et al.*, 2008).

La función de los receptores 5-HT<sub>5A</sub> no se ha caracterizado por completo, hasta el momento se les ha atribuido función en el control del ciclo circadiano (Duncan *et al.*, 2010) entre otras posibles funciones. Los estudios realizados por Rees *et al.*, 1994 demostraron que existe una importante similitud entre los receptores 5-HT<sub>5A</sub> y los receptores 5-HT<sub>1D</sub>, conduciendo a la especulación de que algunas de las acciones atribuidas a estos receptores 5-HT<sub>1D</sub> (es decir, control motor, ansiedad, comportamiento de alimentación), en realidad podrían involucrar a los receptores 5-HT<sub>5A</sub>. Recientemente se identificó al receptor 5-HT<sub>5A</sub>, como un factor que está fuertemente asociado con los niveles plasmáticos de triglicéridos elevados en la población del norte de Europa, esto sugiere un potencial cerebral específico de regulación de los niveles de triglicéridos en plasma, posiblemente por la alteración de la expresión de 5-HT<sub>5A</sub>, contribuyendo a los índices de obesidad (Zhang *et al.*, 2010).

## 2.8 Obesidad y receptores a serotonina en el hipocampo

Un set completo de sistemas neuroendocrinos controla el comportamiento de la alimentación, la energía y la homeostasis de la glucosa. Los péptidos y neurotransmisores interactúan cercanamente en el hipotálamo, donde las hormonas periféricas, metabólicas y señales nutricionales son integradas para regular estos procesos fisiológicos. Se ha buscado elucidar la regulación serotoninérgica de la función hipotalámica sin llegar a comprenderla completamente. Múltiples subtipos de receptores a 5-HT se expresan en las regiones hipotalámicas implicados en el equilibrio energético incluyendo el 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>7</sub>. De estos, el subtipo 5-HT<sub>1B</sub> ha sido el más fuertemente implicado en la supresión de la alimentación (Tecott, 2007). Sin embargo la red neural responsable de la integración total de este sistema, no es limitada al

hipotálamo, sino que incluye otras importantes estructuras celulares como el hipocampo (Banas *et al.*, 2009).

El hipotálamo y el hipocampo reciben serotonina del núcleo de rafe; sin embargo el hipocampo se encuentra relacionado más específicamente en el control de las funciones cognitivas relacionadas con la comida; también se ha reportado un incremento en la liberación de 5-HT en el hipocampo asociado al consumo de alimentos. En el hipocampo medial la liberación de 5-HT se incrementa después del consumo de alimentos, pues al ser un anorexigénico, su liberación posterior al inicio de la alimentación, representaría el comienzo de las señales de saciedad para detener el consumo de alimentos (Banas *et al.*, 2009).

Toda la familia de receptores a serotonina se encuentra expresada en el hipocampo, es parte del sistema límbico (sistema relacionado con el procesamiento de la memoria, juicio, afecto y motivación de las acciones planeadas). La innervación de las vías serotoninérgicas en el hipocampo y la expresión diversa de los receptores a serotonina en esta área del cerebro, reflejan las funciones generales relacionadas a la 5-HT, en particular con la cognición, humor e ingesta de alimentos (Berumen *et al.*, 2012); la distribución de la expresión de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> durante la ontogenia en el hipocampo fue detectada mediante inmunohistoquímica (García-Alcocer *et al.*, 2006).

Al comparar por resonancia magnética nuclear, el encéfalo de adolescentes humanos con exceso de peso contra adolescentes de peso normal se determinó un incremento de volumen en el hipocampo derecho de los adolescentes con exceso de peso, lo cual fue relacionado con el aspecto emocional y motivacional del consumo de alimentos (Moreno-López *et al.*, 2012).

La leptina puede regular la expresión de los receptores a serotonina 5-HT<sub>5A</sub>, como fue reportado en el número de receptores presentes en la membrana de las neuronas en CA1 y el giro dentado del hipocampo, las ratas al ser tratadas con

leptina disminuyeron la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> en comparación con el control (García-Alcocer et al., 2010). Se ha observado que cuando los niveles hipocampales de leptina disminuyen, la plasticidad sináptica se ve modificada, lo cual es importante porque facilita el aprendizaje espacial y también ha sido considerada como un factor principal de la neurogénesis observada en la obesidad (Grillo *et al.*, 2011).

Aún quedan por descubrir funciones de la serotonina en la región del hipocampo y los estudios funcionales concernientes a los efectos en el hipocampo han sido contradictorios, posiblemente dependiendo del tipo de receptor a serotonina que se encuentre involucrado (Bombardi, 2012), como su relación con la ansiedad y el estrés (Graeff *et al.*, 1996), los cuales son moduladores de gran alcance de la conexión cuerpo-mente, que está fuera de equilibrio en individuos obesos (Cizza y Rother, 2012), por lo que es necesario incrementar los estudios en esta región para ampliar los conocimientos de su relación con respecto a la obesidad.

### III. JUSTIFICACIÓN

En el desarrollo de la obesidad se han visto implicados múltiples elementos que conforman una compleja interacción, destacando: el ambiente, la predisposición genética y el comportamiento humano; donde un ambiente rodeado principalmente de alimentos hipercalóricos favorecen el incremento de la masa corporal, considerándose así la obesidad como una patología de arquetipo multifactorial (Nguyen y El-Serag, 2010).

Los péptidos y neurotransmisores interactúan en el hipotálamo, donde las hormonas periféricas, metabólicas y señales nutricionales son integradas resultando en la regulación de la ingesta de alimentos (Banas *et al.*, 2009), por lo tanto la mayoría de las investigaciones, se han centrado en esa región; sin embargo se ha propuesto que la obesidad y más específicamente la obesidad inducida por dietas de tipo occidental pueden alterar la integridad estructural y funcional del hipocampo (Grillo *et al.*, 2011), propiciando una disminución en la tasa de neurogénesis en esta estructura (Lindqvist *et al.*, 2006) y con ello provocando una deficiencia en la memoria y aprendizaje, la cuales se procesan en el hipocampo (Winocur *et al.*, 2005).

La 5-HT se encuentra relacionada como un factor de desarrollo neuronal y por supuesto como regulador del control del apetito. El aumentar los niveles del precursor 5-HTP o interrumpir la función neuronal de la 5-HT mediante lesiones, produce efectos profundos en la disminución de la alimentación en los roedores. Además, los fármacos relacionados con 5-HT como los agonistas y los inhibidores de la recaptura reducen el consumo de alimentos, de forma consistente con el realce de la saciedad (Halford y Harrold, 2012), logrando así restablecer la conexión hambre-saciedad cuerpo-mente, que está fuera de equilibrio en individuos obesos (Cizza y Rother, 2012).

La relación del receptor 5-HT<sub>2C</sub> con el control de la ingesta de alimentos aunado a la escasa información concerniente a la relación entre la obesidad con los receptores a serotonina 5-HT<sub>5A</sub> y la variabilidad en la expresión de los receptores en el hipocampo cuando se somete a una dieta alta en energía, abre una ventana de oportunidad para resolver varias interrogantes que ayudarán a comprender más la patología de la obesidad. Una investigación que comprenda los receptores serotoninérgicos aumentará el conocimiento de la regulación serotoninérgica y sus implicaciones en la ingesta de alimentos por lo que se tendrá una mayor precisión de los mecanismos implicados en el desarrollo y origen de la irregularidad alimenticia, donde se ven implicados procesos afectivos, de memoria y plasticidad como uno de los posibles orígenes de la misma.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La obesidad inducida por dieta y una dieta suplementada con triptófano genera cambios en la expresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas *Sprague-Dawley*.

## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Determinar los cambios de expresión de los receptores a serotonina 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas *Sprague-Dawley* con obesidad inducida por una dieta alta en energía y suplementada con triptófano.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Emplear una dieta alta en energía (HED) para inducir obesidad a ratas *Sprague-Dawley* jóvenes.
- Emplear una dieta alta en energía (HED) para inducir obesidad a ratas *Sprague-Dawley* jóvenes suplementada con triptófano.
- Semicuantificar la expresión de los receptores a serotonina 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> mediante la técnica de inmunohistoquímica en el hipocampo de ratas control y obesas y comparar los cambios de expresión.
- Cuantificar la expresión proteica de los receptores a serotonina 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> mediante la técnica de *western blot* en el hipocampo de ratas control y obesas y comparar los cambios de expresión.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Reactivos

- Solución buffer de sales de fosfatos (PBS) 10X.
- Solución de p-formaldehído (PFA) al 4% en PBS1X.
- Sacarosa al 30% en PBS1X.
- Medio para congelación de tejidos (*Jung*®).
- Solución buffer de fosfato con Tritón al 0.5% (PBT).
- Peróxido de hidrógeno al 1% en PBS1X.
- Leche en polvo descremada al 3% y 5% en PBT (Biorad®).
- Anticuerpo primario contra  $\beta$ -actina hecho en cabra (Santa Cruz®).
- Anticuerpo primario contra 5-HT<sub>2C</sub> hecho en conejo (Santa Cruz®).
- Anticuerpo primario contra 5-HT<sub>5A</sub> hecho en conejo (Santa Cruz®).
- Anticuerpo secundario peroxidado anticabra hecho en conejo (Santa Cruz®).
- Anticuerpo secundario peroxidado anticonejo hecho en cabra (Santa Cruz®).
- Anticuerpo secundario biotinilado anticonejo hecho en cabra (Santa Cruz®).
- Buffer amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.1).
- Tabletas inhibidoras de proteasas (Roche®).
- Reactivo de Bradford (Biorad®).
- Solución estándar 1 mg/mL de BSA.
- Amortiguador de carga en relación 1:1 (H<sub>2</sub>O destilada, Tris-HCl 0.125 M, glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0.02%, 2-mercaptoetanol 200 mM).
- Membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences®).
- Geles de poliacrilamida (29% acrilamida; 0.8% bis-acrilamida) al 7.5%.
- Marcador de peso molecular (Amersham Biosciences®).
- Buffer amortiguador de transferencia (3.03 g Tris-base, 14.4 g glicina; 200 mL metanol; H<sub>2</sub>O destilada a 1 L).
- TBS (Tris-HCl 1.0 mM, NaCl 15 mM, pH 8).

- Reactivo de detección preparado 1:1 soluciones 1 y 2 luminol y peróxido de hidrógeno del kit ECL (Amersham, GE Healthare®).
- Fijador (Kodak®).
- Revelador (Kodak®).
- Película de autoradiografía (Amersham Biosciences®).
- Alimento para roedores 5001 (Purina®).
- Leche Condensada (Nestlé®).
- Aceite de maíz (Cristal®).
- L-Triptófano (Sigma Aldrich®).

## 6.2 Materiales

- Estuche de disección.
- Cajas petri de plástico.
- Navajas.
- Cajas de refrigeración 4°C (Cryo-Safe®).
- Tubos de 2mL, 1.5mL y 200µL (Eppendorf®).
- Tubos de 50mL y 15mL (Falcon®).
- Refractarios de vidrio con tapa (Pyrex®).
- Vasos de precipitado (Pyrex®).
- Probetas de 500mL, 250mL y 100mL (Pyrex®).
- Micropipetas de 1000µL, 100µL y 20µL (Pipetman®).
- Frascos de vidrio para diluciones (Pyrex®).
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Termómetro.
- Tiras medidoras de Glucosa (Accutrend, Roche®).
- Tiras medidoras de Colesterol (Accutrend, Roche®).
- *Hypercassette* (Amersham Biosciences®).

### 6.3 Equipos

- Estereoscopio (Zeiss, StemiDV4®).
- Criostato (Leica CM 1850®).
- Microscopio con cámara (Axiostar Zeiss, MRC®).
- Plato caliente con agitación.
- Balanza analítica.
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador REVCO (-20 °C y -70 °C).
- Centrífuga Microfuge 22R (Beckman Coulter®).
- Espectrofotómetro (Ultrosepec 2100 pro®).
- Fuente de poder (Biorad®).
- Cámara de electroforesis (Biorad®).
- Cámara de transferencia (Biorad®).
- Transiluminador (Biorad®).
- Equipo para la determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre total (Accutrend, Roche®).

### 6.4 Animales

Se usaron ratas *Sprague Dawley* macho de 21 días de edad, se manipularon de acuerdo a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”. Antes de sacrificarse todos los animales utilizados se mantuvieron entre  $21 \pm 2$  °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y porcentaje de humedad de  $55 \pm 5\%$ , alimentación y suministro de agua *ad libitum*.

## 6.5 Inducción de la obesidad

Se formaron cuatro grupos: 1) ratas expuestas a una dieta control, 2) ratas expuestas a una dieta alta en energía (HED) 3) ratas expuestas a una dieta control y suplementada con triptófano y por último 4) ratas expuestas a una dieta HED suplementada con triptófano. A las ratas con 21 días de nacidas se les colocó durante 4 días en período de adaptación, durante los cuales se les otorgó la dieta control (Purina 5001); a los grupos que fueron sometidos a una dieta diferente a la control, se les presentó diariamente cada tratamiento alimenticio respectivamente por un periodo de 20 minutos, para después retirarlo y colocar la dieta control. Pasado el período de adaptación, los animales fueron sometidos a cada uno de los tratamientos alimenticios por 15 semanas, con disposición *ad libitum*; una vez pasado el periodo, las ratas fueron sacrificadas.

El contenido de las dietas para cada grupo fue: la dieta HED estaba compuesta por un 48% de alimento Purina 5001, 44% de leche condensada y 8% de aceite de maíz y el suplemento de triptófano consistió en 1g de L-triptófano por cada 100g de alimento. Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el contenido calórico en cada tipo de alimentación. La dieta HED mostró un mayor contenido calórico (aprox. 4.15 kcal/gr), en comparación a una dieta regular o CTR (aprox. 4.03 kcal/gr).

## 6.6 Medición de parámetros bioquímicos

Las ratas se pesaron semanalmente y quincenalmente se les extrajo sangre de la cola para determinar el nivel de glucosa con las tiras reactivas; también se realizó una medición al final del tratamiento del colesterol total. Ambos parámetros fueron determinados con el equipo Accutrend® GCT. El método que utiliza el aparato es mediante la incidencia de luz de un diodo emisor de luz (DEL).

En la parte inferior de la tira reactiva; se aplica una gota de sangre en la zona de test de la tira la sustancia a determinar en la muestra aplicada representa una reacción enzimática produciendo una coloración cuya intensidad depende de la concentración de la sustancia a determinar. La intensidad del color se medirá iluminando la zona de test situada en la parte inferior de la tira con el DEL y midiendo la intensidad de la luz reflejada con un detector. Para calcular el resultado se evalúa la señal de la luz reflejada teniendo en cuenta el valor del blanco medido inicialmente y los datos de que dispone el aparato previamente programados. Los límites de detección manejados son: Glucemia 20 – 600 mg/dL y para Colesterol 150 – 300 mg/dL.

### 6.7 Inmunohistoquímica

El sacrificio de las ratas se llevó a cabo aplicando pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso para anestesarlas. Las ratas fueron sometidas a una perfijación con p-formaldehído realizando una perfusión cardiaca. Los encéfalos se extrajeron y se colocaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de fijación se enjuagó en buffer de fosfatos (PBS 1X). Los tejidos se incubaron después en una solución de sacarosa al 30% en PBS y se refrigeraron a 4°C durante 2 días. A continuación se sumergieron en un medio de congelación dentro de un molde y se guardaron a -70°C.

Posteriormente se llevaron a cabo cortes coronales de 12 µm de espesor en el criostato y fueron colocados en portaobjetos (tres cortes por cada laminilla), los cuales fueron almacenados a -20°C. Las laminillas se seleccionaron de acuerdo a dónde se podían apreciar en el menor volumen posible del hipocampo todas sus regiones y se colocaron en una cámara húmeda. Se lavaron con PBS 1X, se cubrió la cámara con papel aluminio para proteger de la luz; a continuación en cada laminilla se colocaron 500µL de la solución de peróxido de hidrogeno al 1%, para

bloquear la peroxidasa endógena, dejándose incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo se procedió a hacer 3 lavados y posteriormente se adicionó la solución de bloqueadora de leche en PBT. Después se volvió a lavar tres veces con buffer de fosfato con tritón (PBT 0.5%). Consecutivamente se aplicaron 300µL de los anticuerpos primarios hechos en conejo en dilución para 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub>, se conservaron incubando a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente en la mañana se realizaron 3 lavados, después se colocaron en cada laminilla 300µL de una dilución en PBT 0.5% del segundo anticuerpo hecho en cabra anticonejo para 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub>, esta vez se dejó incubar con el segundo anticuerpo 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron nuevamente las laminillas 3 veces con PBT 0.5%. Se incubó durante media hora con el reactivo para amplificación ABC y se realizaron 3 lavados con PBT 0.5%.

Para revelar la marca inmunorreactiva, en una cámara se colocó PBS1X 0.042g de diaminobencidina y 612.5µL de peróxido de hidrógeno al 3%. Se sumergieron las laminillas en la cámara en la oscuridad hasta que te tejido tomó una coloración café claro. Posteriormente se aplicó una gota de glicerol al centro de cada laminilla, se colocó el cubreobjetos, dejándolo caer sin presionarlo. Por último, ya fijadas las laminillas, se observaron en un microscopio de campo claro.

#### 6.7.1 Densitometría

Las fotografías del hipocampo completo y de cada una de las regiones (CA1, CA2, CA3 y DG) se tomaron a cuarto cerrado con el microscopio Axiostar, acoplado a una cámara digital AxioCam MRC Zeiss. De las fotografías seleccionadas de las distintas regiones y tratamientos, se midió la marca reactiva cuantificando la escala de gris con el software KS-300 Zeiss. Para cada una de las imágenes se registraron

los valores de MEAN/grey, STDD/grey, MIND/grey, MAXD/grey, SUMD/grey, SUMQD/grey2, AREA/micrometer2) para analizar los resultados se trabajó con el dato SUMQD/grey2.

## 6.8 Western blot

### 6.8.1 Extracción de proteínas a partir de tejido

El sacrificio de las ratas se llevó a cabo aplicando pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso para anestesarlas, se decapitó a los animales para extraer el encéfalo y el hipocampo, congelándose a -70 °C hasta su utilización. El tejido se homogenizó en amortiguador de lisis (25 mM Tris-HCl pH 7.1) suplementado con inhibidores de proteasas (Tabletas Complete Mini, Roche). Posteriormente el homogenizado se incubó 1 hora a 4 °C en agitación y se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm a 4 °C, se recuperó el sobrenadante, luego se volvió a centrifugar 15 minutos a 12000 rpm a 4°C, las proteínas se localizaron en el sobrenadante.

### 6.8.2 Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas celulares contenidas en los homogenizados se determinó por el método de Bradford. Se preparó una curva de calibración por triplicado a concentraciones: 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL de BSA (albúmina bovina sérica 0.1 mg/mL) como se muestra en la Tabla 5. Se realizó la curva de calibración, graficando absorbencia a 595 nm contra concentración de proteína.

Para realizar la cuantificación de proteínas, se tomaron 2 µL de muestra, se diluyeron con 798 µL de H<sub>2</sub>O destilada, y se agregó 200 µL de azul de Coomassie a cada una de las muestras. Se prepararon duplicados de las muestras. Las muestras fueron incubadas durante 5 min y se leyó la absorbencia a 595 nm y

mediante la ecuación de la recta, se interpolaron los datos de las muestras para obtener la concentración de proteína total.

Tabla 5. Preparación de curva de calibración de proteínas

Celda	Conc. BSA ( $\mu\text{g}$ )	H <sub>2</sub> O ( $\mu\text{L}$ )	Soln. Stock BSA ( $\mu\text{L}$ )	Reactivo de Bradford ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	0	800	0	200
1	2.5	775	25	200
2	5	750	50	200
3	10	700	100	200
4	15	650	150	200
5	20	600	200	200

### 6.8.3 Electroforesis SDS-PAGE

Se realizaron cálculos para cargar 8  $\mu\text{g}$ , 35  $\mu\text{g}$  y 50  $\mu\text{g}$  de proteína por pozo para identificar a la  $\beta$ -actina, al receptor 5-HT<sub>2C</sub> o al receptor 5-HT<sub>5A</sub> respectivamente. Antes de cargar las muestras en el gel se adicionó amortiguador de carga en relación 1:1 (H<sub>2</sub>O destilada, Tris-HCl 0.125 M, glicerol 20%, SDS 4%, Azul de bromofenol 0.02%, 2-mercaptoetanol 200 mM), adecuándose a un volumen de carga de 20  $\mu\text{L}$  y se hirvieron durante 5 min.

Se prepararon geles de poliacrilamida (29% acrilamida; 0.8% bis-acrilamida) al 7.5%, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular, se corrió la

electroforesis durante 15 minutos a 100 V y 35 minutos a 150 V hasta que el azul de bromofenol llegó al final del gel.

#### 6.8.4 Electrotransferencia

Al concluir la separación de las proteínas en función de su peso molecular, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences). Para ello, los siguientes materiales se prehumedecieron en amortiguador de transferencia (3.03 g Tris-base, 14.4 g glicina; 200 mL metanol; H<sub>2</sub>O destilada a 1 L) en el siguiente orden: cátodo, esponja, papel Whatman, gel, membrana, papel Whatman, esponja, ánodo, debido a la carga negativa de las proteínas migraron hacia el ánodo. Se transfirió 1 hora a 120 V.

#### 6.8.5 *Blotting*

Luego de la transferencia, la membrana se lavó durante 10 minutos en PBS1X para eliminar restos de poliacrilamida y se bloqueó con una solución de leche en polvo descremada en PBS1X de 3 a 5 horas, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la membrana. Se lavó tres veces con PBS1X y se incubó con los anticuerpos primarios para  $\beta$ -actina y para los receptores diluidos en PBT 0.5% toda la noche a 15°C. Concluida la incubación, se lavó la membrana 3 veces en PBS1X y se incubó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa diluido en PBT con leche al 1%. La membrana se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación y por último se lavó tres veces en PBS1X.

#### 6.8.6 Detección y revelado

La detección se realizó por medio del ensayo de quimioluminiscencia potenciada. La membrana se sumergió en el reactivo de detección [preparado 1:1

soluciones 1 y 2 (luminol y peróxido de hidrógeno) del kit ECL], esto provoca una oxidación catalizada por peroxidasa, que produce quimioluminiscencia del luminol. La luz resultante se detecta al exponer la membrana a una película de autoradiografía. El proceso de revelado se llevó a cabo en un cuarto oscuro. El fijador y revelador (Marca KODAK) se preparó diluyendo 70 mL de la solución respectiva a un volumen de 250 mL con H<sub>2</sub>O destilada. Se tomó la película de autoradiografía (Amersham Biosciences), y se presionó contra la membrana de nitrocelulosa en el hypercassette durante diferentes tiempos hasta encontrar el ideal. Pasado el tiempo, se tomó la placa y se sumergió en el revelador, se enjuagó con agua, se sumergió en fijador y por último se enjuagó con agua, sumergiéndose la película 1 minuto en cada solución.

Terminado el revelado, en la película se observaron señales que indicarán la presencia de la proteína deseada. Dichas señales se compararon guiadas por el marcador de peso molecular, coincidiendo con el peso de la proteína; mediante estudio densitométrico se evaluó la diferencia de expresión entre cada grupo.

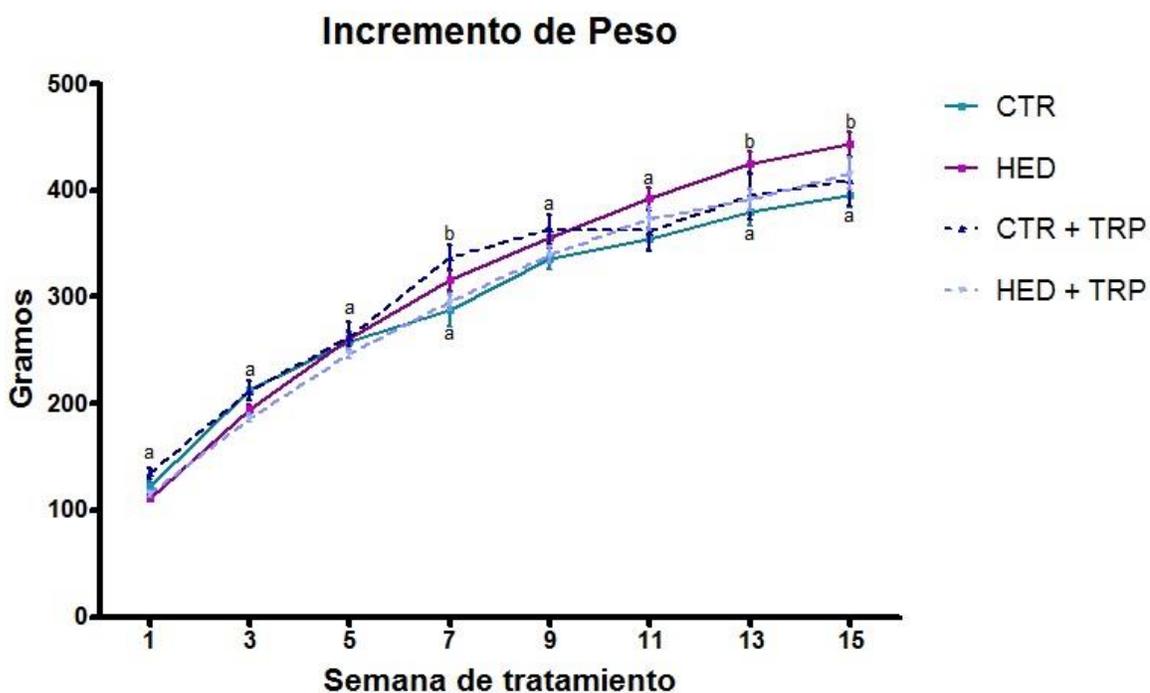
### 6.9 Análisis estadístico

Para encontrar diferencias entre los pesos de los grupos se realizó una prueba de ANOVA de 2 vías con un *post hoc* de Bonferroni, así como para las mediciones de glucosa, consumo de alimento y toma de agua. Para las densitometrías por pares de grupos se utilizó un análisis estadístico T de *student*. En el caso del colesterol y *western blot* se realizó un ANOVA de 1 vía con *post hoc* de Tukey, para así correlacionar si la expresión de las proteínas 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> entre tratamientos poseen diferencias estadísticamente significativas.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Inducción de la obesidad

Se logró inducir obesidad a ratas jóvenes (Figura 2) mediante una dieta alta en energía (HED), los resultados indicaron cambios estadísticamente significativos a partir de la semana 13 a la 15 con respecto a la dieta control (CTR). Los grupos control con triptófano (CTR+TRP) y alto en energía con triptófano (HED+TRP) no presentaron diferencias significativas con respecto al CTR. Se utilizó un test de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías y una prueba posterior de Bonferroni para comparaciones múltiples.

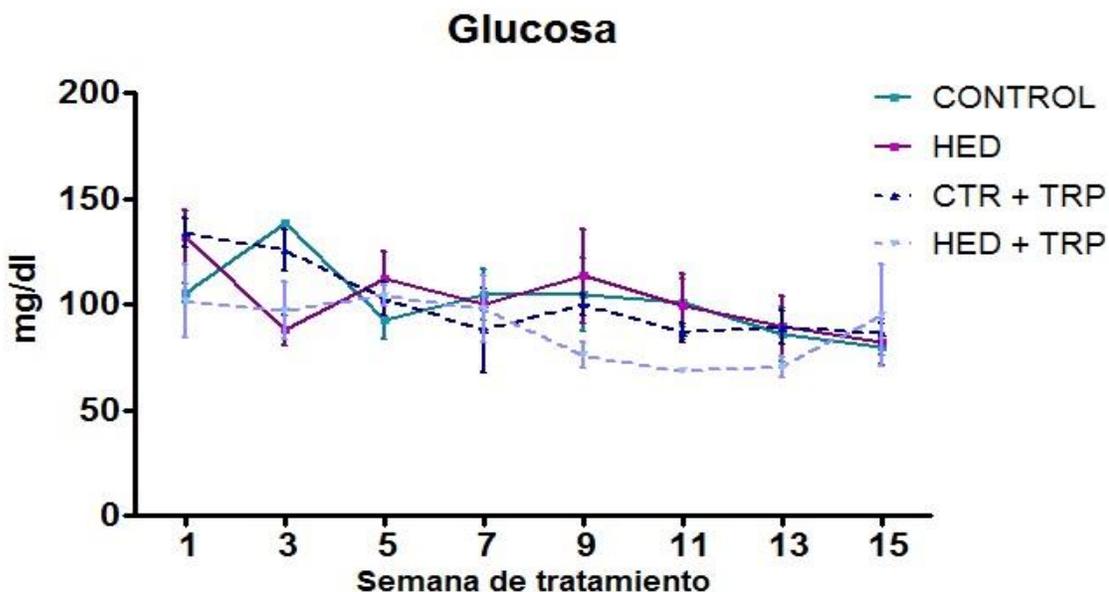


**Figura 2. Incremento de peso corporal.** El peso corporal fue medido semanalmente para cada grupo compuesto de siete ratas respectivamente. Los valores son medias  $\pm$  error estándar (SEM), letra diferente indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$

En los resultados obtenidos es interesante observar que el grupo HED+TRP se mantuvo con el mismo peso promedio, a lo largo de todo el tratamiento en comparación con el grupo CTR+TRP; por lo que las ratas bajo este régimen alimenticio alto en energía pero suplementado con triptófano, no desarrollaron una obesidad inducida por la dieta. Se observó un pico en la semana de tratamiento número 7 para el grupo CTR+TRP, sin embargo el comportamiento se normalizó en las semanas posteriores.

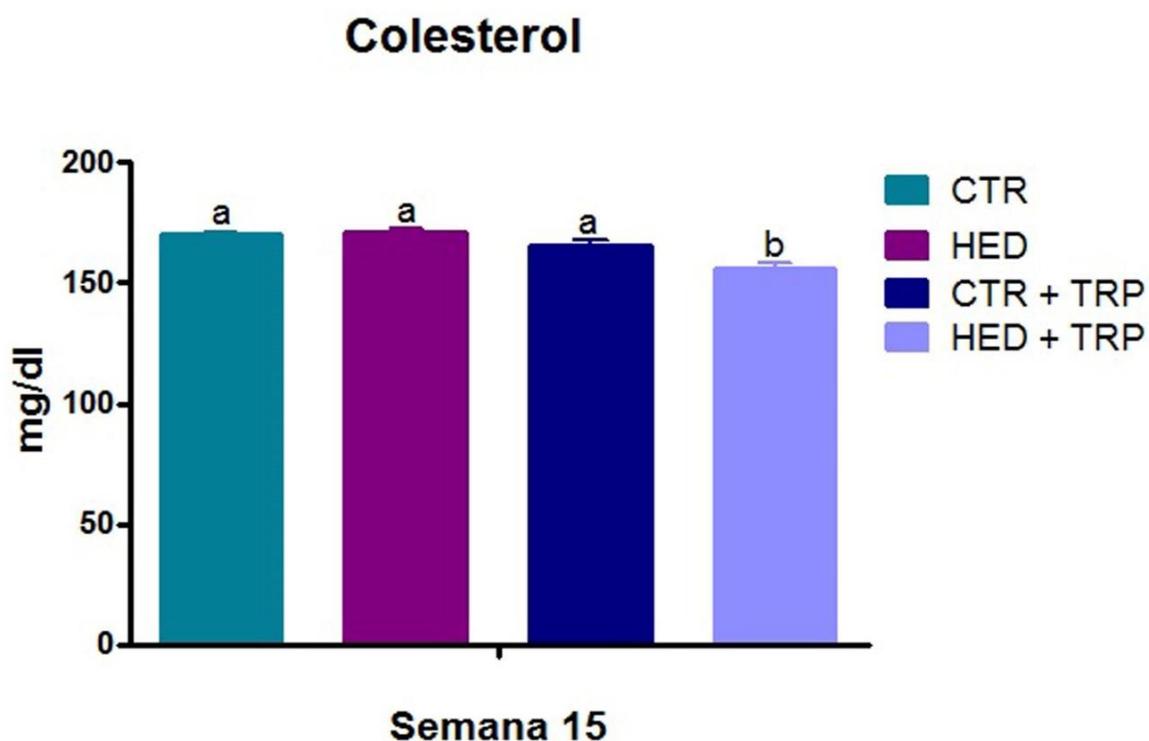
## 8.2 Medición de parámetros bioquímicos

Durante el transcurso del tratamiento, los niveles de glucosa plasmática fueron monitoreados de forma quincenal para detectar cambios en el metabolismo de la misma (Figura 3). Los resultados obtenidos indicaron que el tipo de dieta no varió significativamente los niveles glucémicos entre los grupos, sin embargo se presentó una leve tendencia de disminución gradual de los niveles conforme pasaban las semanas de tratamiento.



**Figura 3. Glucosa plasmática.** Las medidas fueron realizadas quincenalmente. Los valores son medias  $\pm$  SEM, (mg/dL)

Una única medición se realizó en la semana 15 del tratamiento para determinar el nivel de colesterol total (Figura 4). Los niveles plasmáticos fueron significativamente menores para el grupo HED+TRP con un valor medio de 156 mg/dL en comparación con los grupos CTR, HED y CTR+TRP donde los parámetros se encontraron en 169 mg/dL, 173 mg/dL y 165 mg/dL respectivamente.

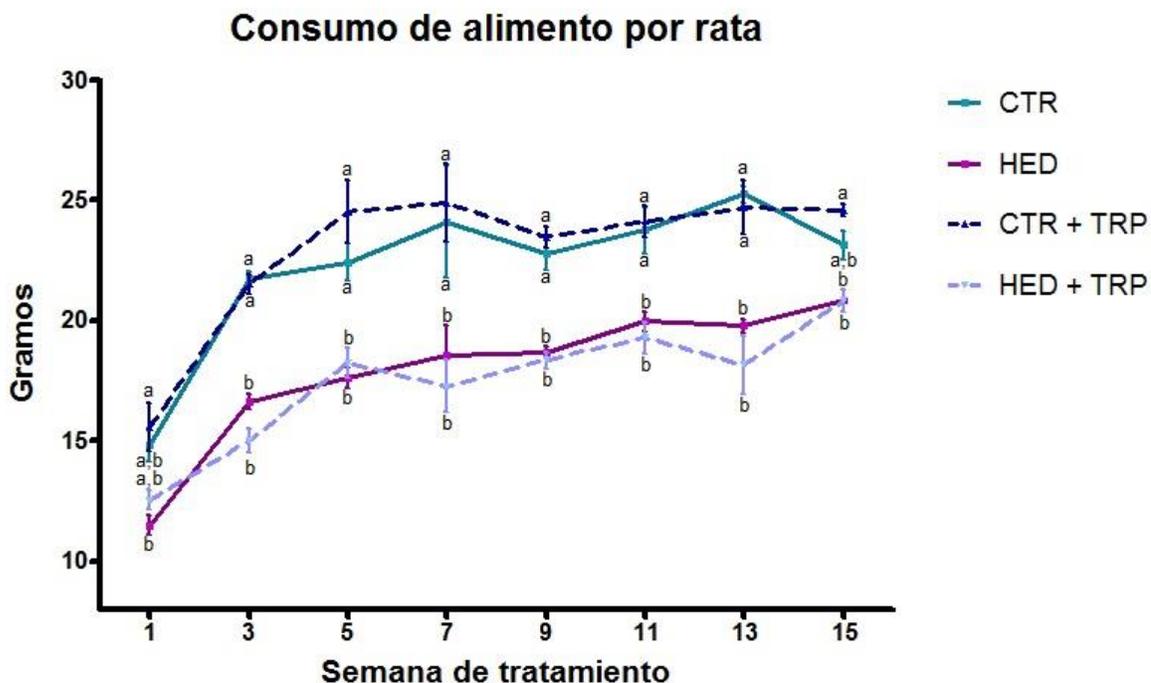


**Figura 4. Colesterol total.** Tratamiento (medido a la semana 15). Los valores son medias  $\pm$  SEM. Se realizó un análisis de ANOVA de una vía seguido por un *post hoc* de Tukey. La letra distinta indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$

### 8.3 Consumo de alimento

En la Figura 5 se presenta el valor promedio diario del consumo de alimento en gramos por semana de tratamiento. Los grupos CTR y CTR+TRP reportaron un consumo significativamente mayor en comparación con las otras dos dietas a

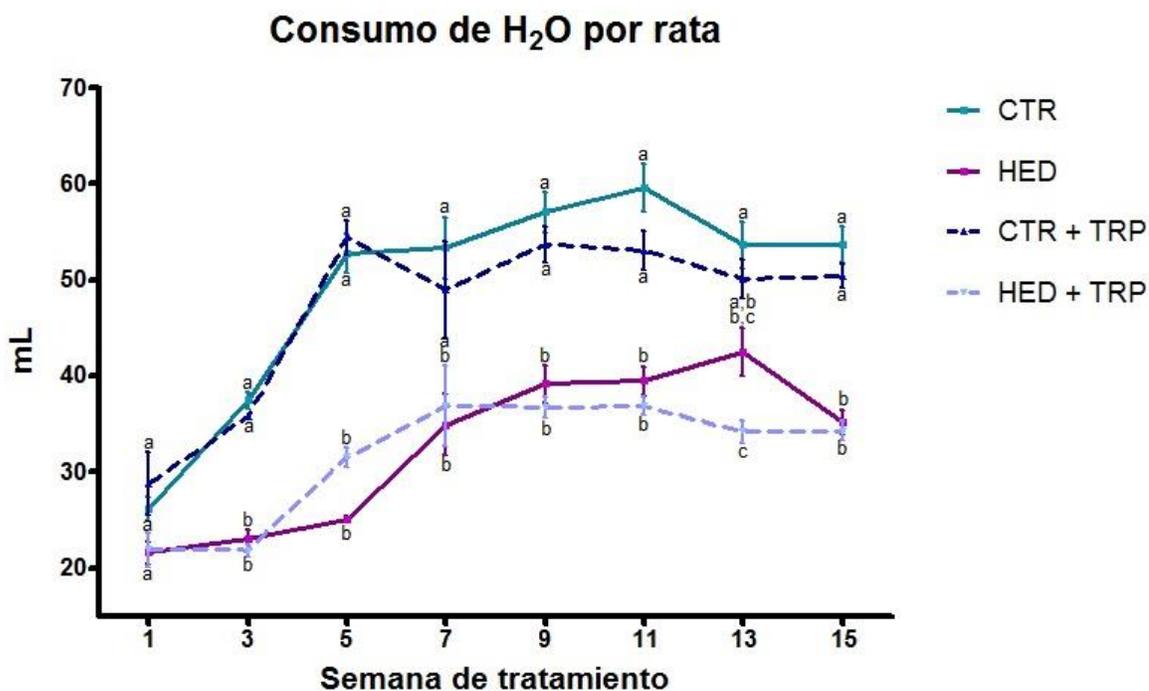
excepción de la semana 15 y última del tratamiento donde las pruebas estadísticas revelaron que no se encontró diferencia entre los grupos.



**Figura 5. Consumo de alimento.** La gráfica muestra el promedio diario de comida consumida en gramos por semana. Los valores son medias  $\pm$  SEM. Letra diferente indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$  de acuerdo a un análisis de ANOVA de 2 vías seguido por un *post hoc* de Bonferroni

#### 8.4 Consumo de agua

Asimismo se monitoreó la cantidad de agua en mililitros consumida diariamente en promedio semanal por rata (Figura 6). Los grupos con dieta CTR y CTR+TRP bebieron más agua de forma estadísticamente significativa en comparación a aquellas expuestas a una dieta de tipo HED y HED+TRP. Es interesante mencionar que se obtuvieron en promedio 20 mL de diferencia entre el consumo de agua de los grupos CTR con respecto a los grupos HED, sin importar la adición o no de triptófano; dicha diferencia se mantuvo durante el tratamiento.



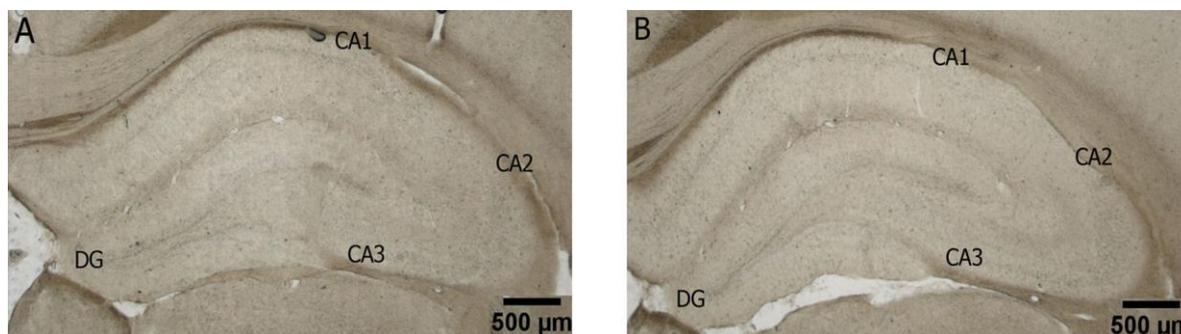
**Figura 6. Consumo de H<sub>2</sub>O.** La gráfica muestra el promedio diario de agua consumida en mililitros por semana. Los valores son medias  $\pm$  SEM. Letra diferente indica diferencia significativa  $P \leq 0.05$  de acuerdo a un análisis de ANOVA de 2 vías seguido por un *post hoc* de Bonferroni

### 8.5 Determinación de los niveles de expresión de receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> por inmunohistoquímica

Se observó la distribución de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas, con el método de inmunohistoquímica basado en la reacción de peroxidasa amplificada acoplada a biotina y revelada con DAB en cortes de tipo coronal del encéfalo. El corte permitió diferenciar fácilmente las regiones típicas que conforman el hipocampo: CA1, CA2, CA3 y DG.

Las condiciones idóneas de anticuerpos primarios y secundarios fueron estandarizadas por subtipo de receptor, para mostrar la proporción necesaria de marca inmunorreactiva (MIR) sin interferencia del fondo. Con la idea de precisar la

posible marca inespecífica del anticuerpo secundario, se realizaron los experimentos en donde una laminilla era blanco a la que se agregaron todos los reactivos con excepción de anticuerpo primario (Figura 7). En los experimentos no se encontró marca inmunorreactiva con lo que queda comprobado que el anticuerpo secundario no induce marca inespecífica.

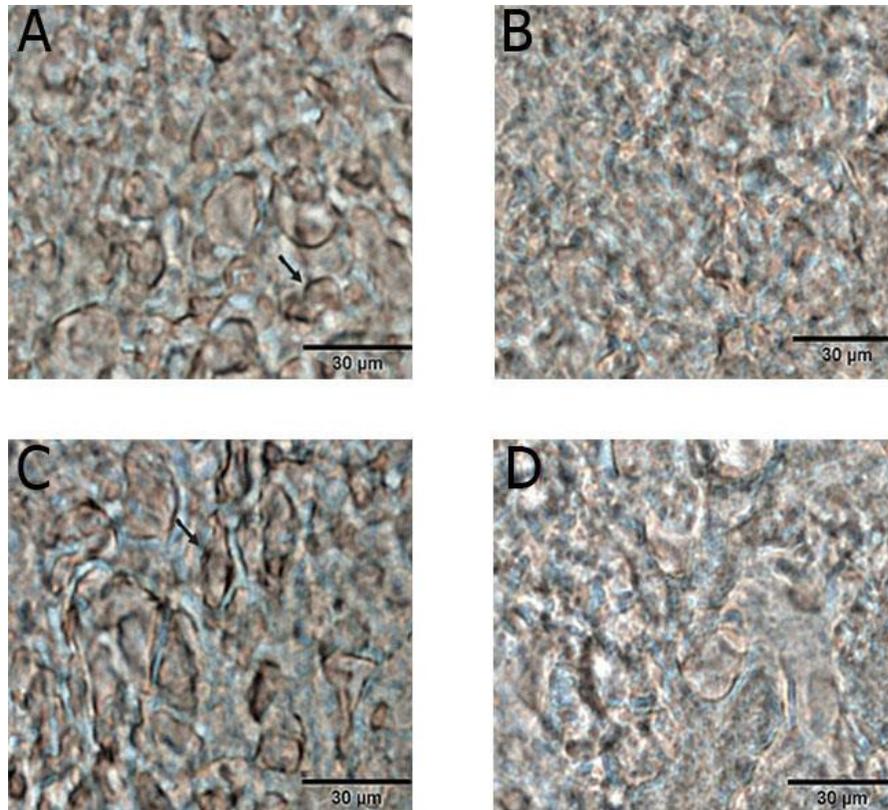


**Figura 7. Tejidos blancos.** Se muestran cortes de tipo coronal del hipocampo derecho a los cuales no se les aplicó anticuerpo primario y por lo tanto no muestran MIR. A) Blanco de tejido para el receptor 5-HT<sub>2C</sub>, B) Blanco de tejido para el receptor 5-HT<sub>5A</sub>. Fotos 1,25x.

En los grupos problema se consideró la presencia de MIR cuando se aplicó el anticuerpo primario y en las muestras se observó marca en las membranas celulares (Figura 8) Para los diferentes grupos de dietas CTR, HED, CTR+TRP y HED+TRP, se realizaron por triplicado las respectivas inmunohistoquímicas procediéndose a analizar la distribución de la MIR y los cambios de expresión que presentaban los hipocampos para cada receptor 5-HT<sub>2C</sub> o 5-HT<sub>5A</sub> en las distintas regiones del hipocampo CA1, CA2, CA3 y DG.

En el receptor 5-HT<sub>2C</sub> se observó sin distinción de grupo que la principal ubicación de las células positivas a MIR fueron las neuronas piramidales y en menor grado las de tipo granular. De igual forma se observó para el receptor 5-HT<sub>5A</sub>, la MIR localizada primordialmente en las neuronas piramidales y en un menor grado en las neuronas granulares. Las células piramidales se encuentran ubicadas en la región CA1, CA2 y CA3, el soma asume una forma triangular mide aproximadamente 20µm de longitud, con un solo axón, una larga dendrita apical,

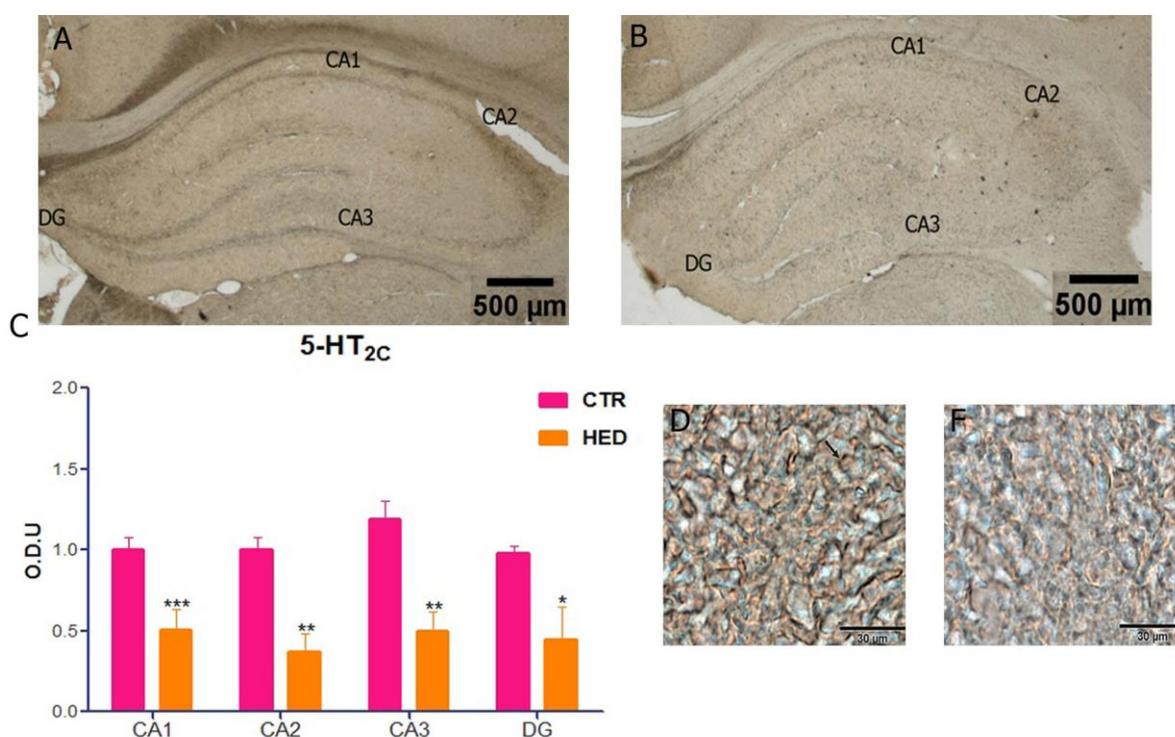
múltiples dendritas basales y espinas dendríticas. El giro dentado contiene una capa densamente empaquetada de células granulares (de 4 a 10 células de grosor), las células son pequeñas (cerca de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro) con soma de forma esférica; son neuronas monopolares, y sus axones son conocidos como fibras musgosas.



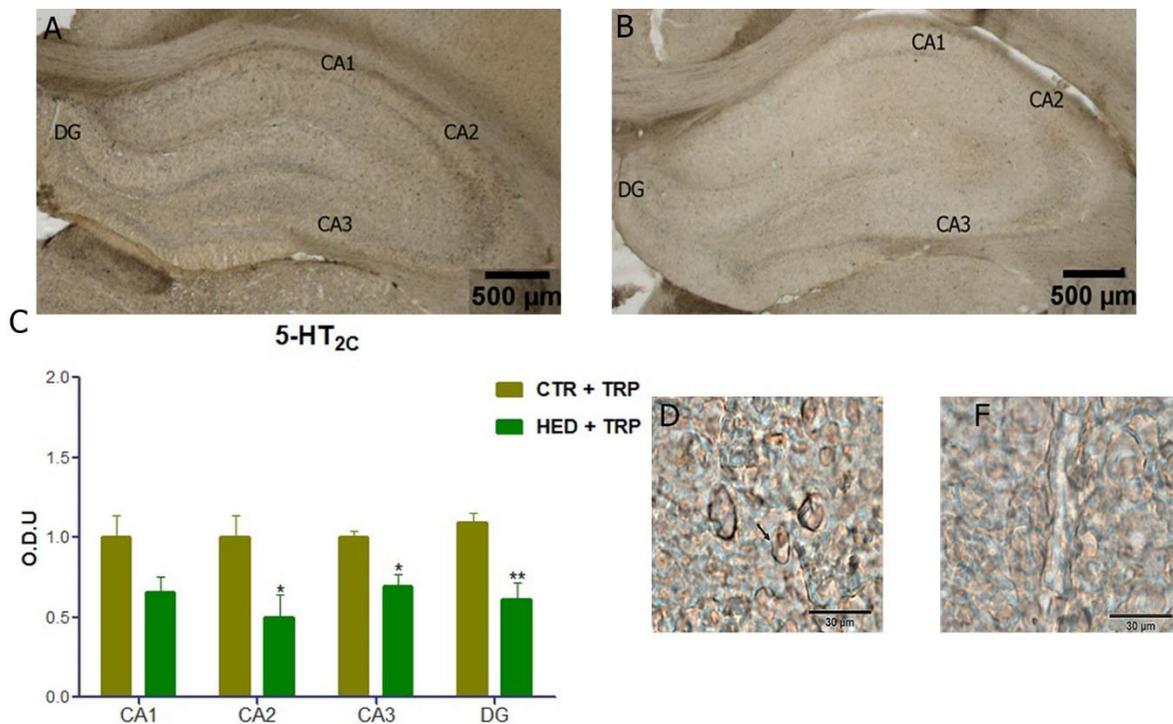
**Figura 8. Marca inmunorreactiva en neuronas hipocampales.** A) Células positivas a MIR para el receptor 5-HT<sub>2C</sub> en CA2 B) Células blanco para el receptor 5-HT<sub>2C</sub> en CA2 C) Células positivas a MIR para el receptor 5-HT<sub>5A</sub> en CA2 D) Células blanco para el receptor 5-HT<sub>5A</sub> en CA2. Fotos 40x.

La densitometría para la MIR fue semicuantificada con el software KS-300, lo cual requirió cierto tipo de precauciones al momento de tomar las fotografías, para evitar al máximo variabilidad ajena a dicha marca. Los datos obtenidos se trabajaron en escala de SUMQD/grey2 para determinar en densidad óptica las diferencias estadísticamente significativas con una  $P < 0.05$ .

La semicuantificación de la MIR para el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2C</sub> se realizó por pares de grupos de tratamiento (con o sin triptófano). La prueba estadística T de *student* reveló que para el grupo HED el receptor mostró una disminución en la expresión en comparación con la mostrada por el grupo CTR de forma estadísticamente significativa para las regiones hipocámpales CA1, CA2, CA3 y DG (Figura 10). Un comportamiento similar se produjo entre los grupos CTR+TRP y HED+TRP; ya que el grupo HED+TRP redujo significativamente la MIR con respecto a la dieta CTR+TRP; pero a diferencia del tratamiento sin triptófano las disminuciones exclusivamente fueron visibles para las regiones CA2, CA3 y DG (Figura 11).

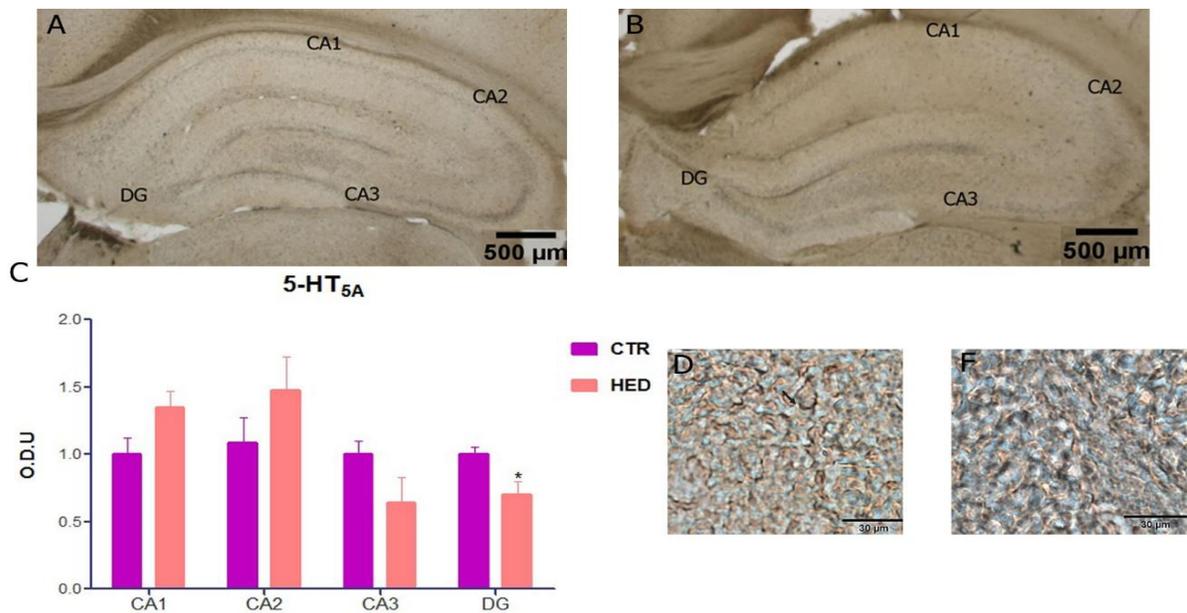


**Figura 9. Inmunohistoquímica de 5-HT<sub>2C</sub> para CTR y HED.** A) Hipocampo CTR B) Hipocampo HED C) Gráfica comparativa de la densitometría entre CTR y HED los asteriscos representan una diferencia significativa, T de *student*. \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\* P≤0.001. D) Células positivas a MIR para 5-HT<sub>2C</sub> en DG F) Células blanco para 5-HT<sub>2C</sub> en DG. Fotos 1,25x y 40x respectivamente

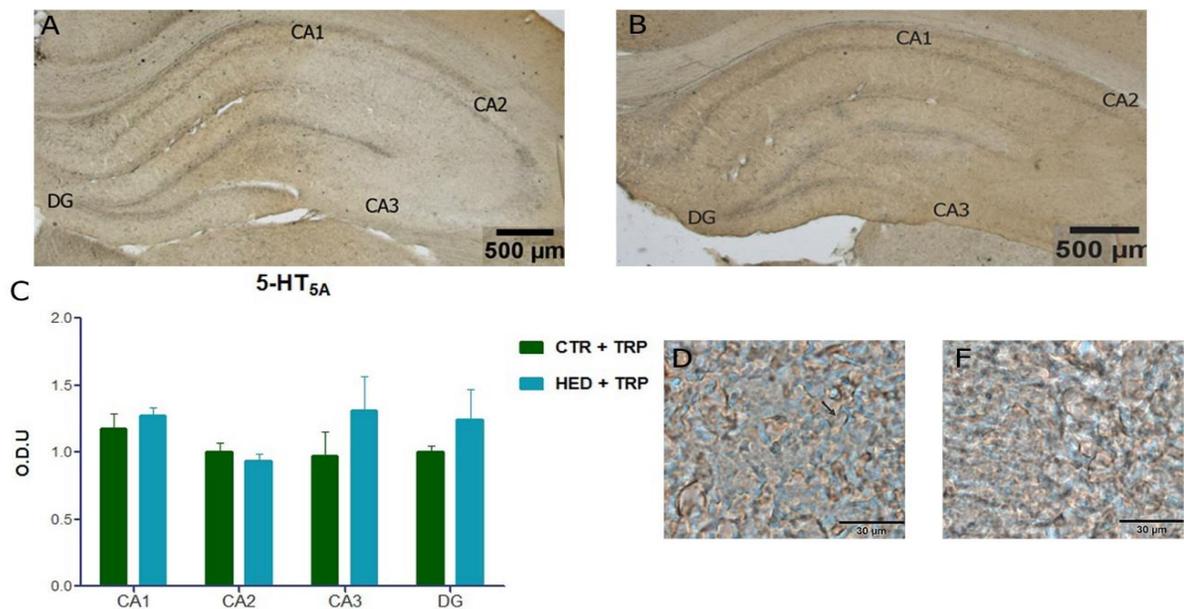


**Figura 10. Inmunohistoquímica de 5-HT<sub>2C</sub>.** para CTR+TRP y HED+TRP. A) Hipocampo CTR+TRP B) Hipocampo HED+TRP C) Gráfica comparativa de la densitometría entre CTR+TRP y HED+TRP los asteriscos representan una diferencia significativa, T de *student*. \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\* P≤0.001. D) Células positivas a MIR para 5-HT<sub>2C</sub> en CA1 F) Células blanco para 5-HT<sub>2C</sub> en CA1. Fotos 1,25x y 40x respectivamente

La semicuantificación de la MIR para el receptor 5-HT<sub>5A</sub> se realizó de forma análoga a la del receptor 5-HT<sub>2C</sub> comparando por pares de grupos de tratamiento (con o sin triptófano). Los resultados indicaron que entre los grupos CTR y HED hay diferencia significativa en la región del giro dentado del grupo HED donde disminuyó; sin embargo cabe resaltar que para las regiones CA1 y CA2 existe un leve incremento de expresión en el receptor del grupo HED sin embargo no fue significativo, mientras que para CA3 no se muestra variación entre los grupos (Figura 12). Con respecto a las dietas CTR+TRP y HED +TRP no se encontraron diferencias significativas entre la expresión del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>5A</sub> para ninguna de las regiones del hipocampo mediante la prueba T de *student* (Figura 13).



**Figura 11. Inmunohistoquímica de 5-HT<sub>5A</sub> para CTR y HED.** A) Hipocampo CTR B) Hipocampo HED C) Gráfica comparativa de la densitometría entre CTR y HED los asteriscos representan una diferencia significativa. \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\* P≤0.001. D) Células positivas a MIR en DG F) Células blanco en DG. Fotos 1,25x y 40x respectivamente



**Figura 12. Inmunohistoquímica de 5-HT<sub>5A</sub> para CTR+TRP y HED+TRP.** A) Hipocampo CTR+TRP B) Hipocampo HED+TRP C) Gráfica comparativa de la densitometría entre CTR+TRP y HED+TRP D) Células positivas a MIR en CA1 F) Células blanco en CA1. Fotos 1,25x y 40x respectivamente

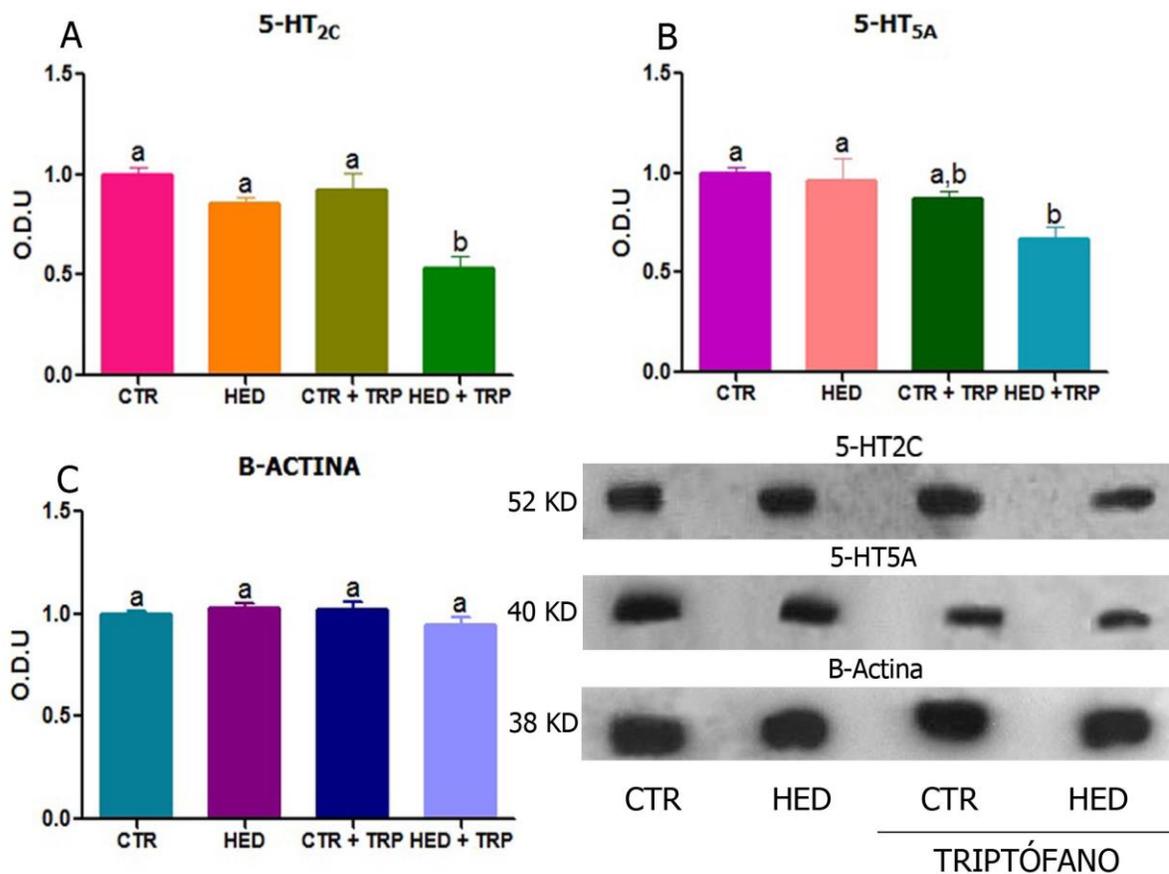
## 8.6 Cuantificación de receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> por *western blot*

La expresión de proteínas en el hipocampo total fue analizada mediante el método de *western blot*, para lo cual inicialmente se procedió a realizar una curva de calibración con una solución de BSA por triplicado. Se obtuvo una ecuación de la línea recta igual a  $y = 0.2256x + 0.3027$  y un coeficiente de correlación igual a  $r = 0.98$ . Una vez realizada la interpolación de los datos obtenidos de las muestras problema, se obtuvieron las concentraciones proteicas de los extractos hipocampales: CTR =  $5.15 \pm 2.48 \mu\text{g}/\mu$ , HED =  $7.76 \pm 1.02 \mu\text{g}/\mu$ , CTR+TRP =  $7.60 \pm 4.32 \mu\text{g}/\mu$  y para HED+TRP =  $8.89 \pm 1.42 \mu\text{g}/\mu$ .

Una vez cuantificadas las proteínas, se realizó el *western blot*; Como control de carga se utilizó la proteína  $\beta$ -actina, la cual presentó su banda característica cercana a los 38 kDa (Figura 14C). Al realizar la densitometría de las bandas correspondientes para los cuatro grupos no se encontraron diferencias significativas con un análisis ANOVA de 1 vía con un *post hoc* de Tukey.

El *western blot* identificó una banda con un peso aproximado de 52 kDa para el receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2C</sub> que corresponde con el esperado (Figura 14A). La semicuantificación densitométrica muestra una señal significativamente menor para el receptor de la dieta HED+TRP con respecto a los otros grupos de dietas y una disminución no significativa del grupo HED con respecto al CTR.

El anticuerpo contra el receptor 5-HT<sub>5A</sub> identificó una banda con un peso aproximado de 40 kDa (Figura 14B) en el hipocampo total para los diferentes grupos de dietas. Se encontró mediante la densitometría una diferencia significativa de la dieta HED+TRP comparada con los grupos CTR y HED; sin embargo HED+TRP no mostró diferencia con respecto al grupo CTR+TRP y éste no mostró diferencias con respecto a los grupos CTR y HED.



**Figura 13. Resumen de resultados para el *Western blot* de 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub>.** La imagen muestra el análisis densitométrico y las bandas obtenidas A) Receptor 5-HT<sub>2C</sub> B) Receptor 5-HT<sub>5A</sub> C)  $\beta$ -actina. Letra diferente representa una diferencia significativa, ANOVA de 1 vía seguido de un *post hoc* de Tukey.  $P \leq 0.05$

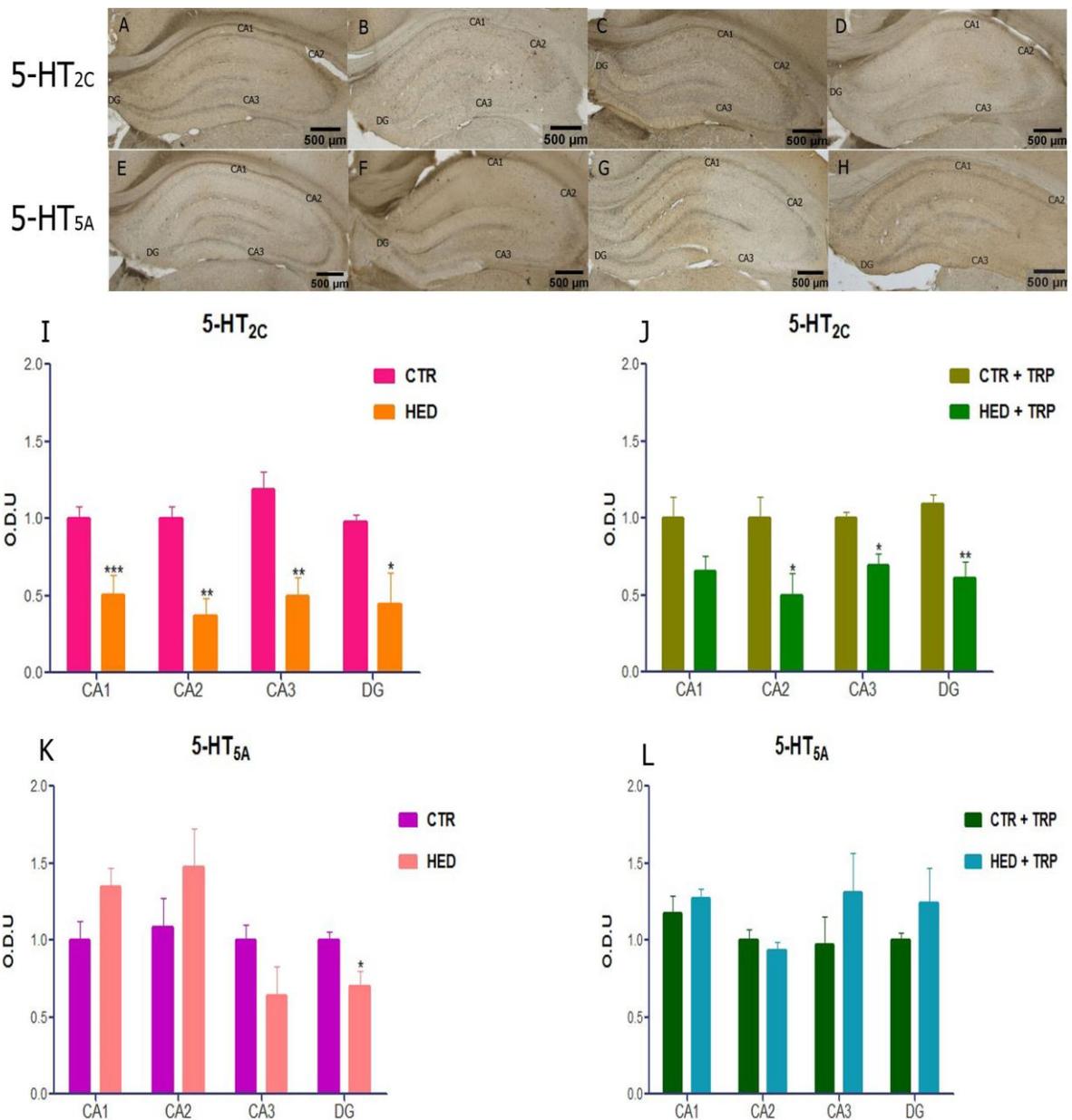
### 8.7 Comparación de resultados entre receptores

En base a la información anterior se puede decir que con la técnica de inmunohistoquímica (Figura 15) se observó una disminución significativa de la expresión del receptor 5-HT<sub>2C</sub> en el hipocampo, en los grupos tratados con una dieta alta en energía, en comparación con aquellas ratas expuestas a una dieta control. Lo mismo se observó cuando la dieta alta en energía se suplementó con triptófano a excepción del área CA1 donde entre controles y tratados con la dieta HED+TRP no hubo diferencia significativa.

Con respecto a la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub>, no se observó ningún cambio significativo en los niveles del receptor entre los animales control y los tratados con HED suplementada o no con TRP a excepción de la región DG, donde se observó una disminución significativa en los animales tratados con HED

Los resultados obtenidos a partir de las inmunohistoquímicas en su conjunto muestran La dieta es capaz de modificar la expresión de los receptores serotoninérgicos de tipo 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas.

Con la técnica de *western blot* se cuantificó la expresión global de los receptores presentes en el hipocampo. Para el receptor 5-HT<sub>2C</sub> es interesante señalar que el grupo HED+TRP se encuentra expresado en menor grado los otros tipos de dietas. Mientras que para el receptor 5-HT<sub>5A</sub> el grupo HED+TRP también disminuyó su expresión, aunque esta diferencia no fue significativa con respecto al grupo CTR+TRP y este grupo no tuvo diferencias al compararse con las dietas sin suplementación del aminoácido.



**Figura 14. Resumen de resultados inmunohitoquímicos de 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub>.** A) CTR para 5-HT<sub>2C</sub> B) HED para 5-HT<sub>2C</sub> C) CTR+TRP para 5-HT<sub>2C</sub> D) HED+TRP para 5-HT<sub>2C</sub> E) CTR para 5-HT<sub>5A</sub> F) HED para 5-HT<sub>5A</sub> G) CTR+TRP para 5-HT<sub>5A</sub> H) HED+TRP para 5-HT<sub>5A</sub> I) Gráfica densitométrica de 5-HT<sub>2C</sub> para CTR y HED J) Gráfica densitométrica de 5-HT<sub>2C</sub> para CTR+TRP y HED+TRP K) Gráfica densitométrica de 5-HT<sub>5A</sub> para CTR y HED L) Gráfica densitométrica comparativa de 5-HT<sub>5A</sub> para CTR+TRP y HED+TRP. Los asteriscos representan una diferencia significativa, T de *student*. \*P≤0.05, \*\* P≤0.01, \*\*\* P≤0.001. Fotos 1,25x

## IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el desarrollo posnatal las ratas cambian a una dieta sólida a las 3 semanas de vida, por lo cual este trabajo se inició en dicha edad y abarcó el periodo de inmadurez, pubertad y adultez joven del animal (Mela *et al.*, 2012). La obesidad en adultos jóvenes se ha asociado con daños neuronales en el hipocampo; pues entre más proporción de cintura cadera se tenga el volumen de dicha estructura disminuye, sugiriendo un daño neuronal (Mueller *et al.*, 2012).

Las ratas *Sprague Dawley* desarrollaron obesidad al consumir una dieta HED con un incremento promedio del 12% de peso corporal con respecto a la dieta control. Estos resultados son consistentes con los previamente reportados por Ricci *et al.*, 2003, quienes aplicaron la dieta alta en energía utilizada en este estudio a ratas *Sprague Dawley* de 21 días y reportaron un incremento del 15% de peso comparado con las ratas tratadas con dieta control. Sin embargo el incremento de peso lo encontraron antes del tiempo que se observó para nuestro experimento.

Los resultados de este trabajo difieren con los de Meguid *et al.*, quienes encontraron un incremento significativo de peso a partir de la onceava semana cabe resaltar que la dieta se suplementó con un suplemento líquido palatable Boost Plus® (Meguid *et al.*, 2004), para ser sometidas posteriormente a una cirugía de bypass gástrico. La discrepancia de dos semanas para desarrollar la obesidad puede ser atribuida a la administración del suplemento. Sin embargo el modelo es válido, porque se obtuvo diferencia significativa de peso en los dos grupos con una dieta tipo occidental.

Es interesante mencionar que los resultados obtenidos en los dos grupos de ratas tratadas con L-triptófano, no se observaron diferencias significativas en el peso entre el grupo CRT+TRP y HED+TRP, el resultado es consistente con los obtenidos en los experimentos realizados por Van Der Stelt *et al.*, 2004, en los cuales a ratas *Sprague Dawley* sujetas a una dieta HED con L-triptófano no

mostraron diferencia con respecto a ratas en dieta control, cabe mencionar que este grupo de investigadores realizaron sus experimentos en ratas adultas y con un período más corto. Nuestros resultados también son consistentes con lo obtenido por Noristani *et al.*, en un modelo de ratón con Alzheimer sometido a un tratamiento por 40 días con dieta 0.40g de Trp/100g de alimento este tipo de alimentación tampoco tuvo diferencia en el peso corporal con respecto al grupo control. Es posible que estos resultados se deban a que una dieta alta en L-triptófano no sólo aumenta la liberación basal de 5-HT, sino que también aumenta la síntesis y almacén de 5-HT que puede estar contribuyendo al control del peso corporal.

Los niveles de glucosa plasmática no se vieron modificados entre grupos a lo largo de las semanas de tratamiento, lo cual sugiere que los procesos metabólicos de la rata fueron capaces de evitar el incremento de este parámetro bioquímico. Estos resultados difieren de los publicados por Archer *et al.*, 2004, donde a ratas *Sprague Dawley* se les compararon los niveles de glucosa entre las dietas CTR y HED, sus resultados indicaron que a las 5 semanas de tratamiento, hubo un incremento glucémico para el grupo HED con una  $P < 0.05$ . Una de las posibles causas por las cuales se encontró la diferencia puede deberse al hecho que en el experimento realizado por Archer, no se monitorearon a lo largo del tratamiento los niveles y la medición se hizo al terminar el experimento (Archer *et al.*, 2004); además se ha reportado que en promedio los niveles plasmáticos de insulina no muestran diferencias significativas si se somete durante 7 semanas a la dieta HED (Ricci y Levin, 2003). Se observó una tendencia a disminuir los valores glucémicos para los 4 grupos a lo largo del tratamiento, esto se atribuye al hecho que bajó el nivel de estrés de los animales al momento de obtener las muestras al estar una vez habituados a la toma de muestra.

Con respecto a la dietas suplementadas con Trp tampoco presentaron alguna diferencia significativa con respecto al control. No existen reportes donde se indique el efecto que tiene una dieta alta en Trp para los niveles plasmáticos de glucosa y tampoco cuando la dieta es HED. Sin embargo Inubushi *et al.*,

encontraron mediante curvas de tolerancia a la glucosa que para ratas con *Diabetes Mellitus* tipo 2, una dieta alta en triptófano suprime los niveles de glucosa sérica después una administración oral, incrementando además el gasto de energía asociado a glucosa en ratas *in vivo* (Inubushi *et al.*, 2012); por lo antes mencionado el consumo de Trp en ratas jóvenes preserva la secreción de insulina y por lo tanto retrasa la progresión de la diabetes.

Los niveles de colesterol sérico fueron cuantificados en la última semana de tratamiento encontrándose una disminución significativa para el grupo HED+TRP en comparación con los grupos CTR, HED y CTR+TRP. Los resultados obtenidos en este trabajo son consistentes con los reportados por Kawada *et al.*, quienes administraron a ratas Wistar una dieta control obteniendo valores de  $104.9 \pm 2.8$  mg/dl y para HED de  $140.3 \pm 12.1$  mg/dl, aunque la dieta HED fue distinta a la aplicada en este estudio, es interesante resaltar que también usaron animales jóvenes (Kawada *et al.*, 1986). En el estudio realizado por Boustany *et al.*, se obtuvieron resultados diferentes encontrando un incremento de los valores de colesterol, esto quizá pueda asociarse al hecho que usaron ratas adultas (Boustany *et al.*, 2004).

Con respecto a la disminución de colesterol en la dieta alta en triptófano, se ha reportado que un alto consumo de dicho aminoácido no afecta significativamente los niveles séricos lipídicos en las ratas (Aviram *et al.*, 1991). Una posible explicación de la disminución de colesterol es que la dieta alta en triptófano induce peroxidación de lípidos plasmáticos e incrementa la captación de colesterol por los macrófagos, debido al incremento de los niveles de serotonina seguidos al consumo de una dieta suplementada con triptófano (Aviram *et al.*, 1991).

Fue mayor el consumo de alimento en gramos por los grupos control comparados con las dietas HED. Sin embargo, la obesidad se logró inducir debido a la procedencia de la energía disponible, pues las cantidades carbohidratos y

grasas varían entre alimentos el control posee 48.7% y 10.7% respectivamente mientras que la dieta HED 50.21% y 15.68%.

Los cambios en la ingesta de alimento son consistentes con lo reportado por Noristani *et al.*, 2012., ellos monitorearon la cantidad de alimento consumido por las ratas, donde una alimentación alta en triptófano no tuvo diferencia significativa en el consumo con respecto al grupo control; sin embargo una dieta con niveles bajos de triptófano produce un incremento en el consumo de alimento El consumo del aminoácido y la consecuente síntesis de 5-HT puede estar contribuyendo al control del peso corporal para el grupo HED+TRP (Noristani *et al.*, 2012).

El agua consumida por los animales fue mayor para los grupos controles sin importar la presencia del triptófano. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en cabras que al ser expuestas a una dieta alta en energía durante 8 semanas mostraron un menor consumo del líquido de forma significativa (Ferreira *et al.*, 2002); así también se observó en ratas expuestas a una dieta control en comparación de una dieta alta en grasas, las primeras consumieron el doble de agua que las segundas (Burr y Burr, 1930). Estudios previos como el realizado por Noristani *et al.*, han remarcado el hecho que la cantidad de agua consumida por ratas sujetas a una dieta alta en triptófano o control, no muestran diferencias significativas entre ambas (Noristani *et al.*, 2012). La causa del mayor consumo de la cantidad de agua ingerida por los grupos control se puede atribuir a que el agua tiene un efecto de saciedad por la distensión de la pared estomacal y el organismo tiene menos deseo de ingerir alimentos placenteros con exceso de calorías (Dennis *et al.*, 2010).

Los resultados de la inmunohistoquímica indicaron que la marca inmunorreactiva para ambos receptores fue localizada principalmente en los cuerpos celulares de las neuronas piramidales las cuales constituyen las regiones CA1, CA2 y CA3. La densidad de axones serotoninérgicos es mayor en CA3, baja en el giro dentado y vuelve a bajar en CA1 siguiendo el patrón de la vía colateral de

Schaffer (Hesler, 2006; Molliver, 1987). La marca fue observada en el soma de las neuronas granulares que componen la región del giro dentado. Estos resultados corroboran los estudios previos en los cuales por la misma metodología se reportó la expresión de diversos receptores serotoninérgicos en el hipocampo (García-Alcocer *et al.*, 2006; Xu y Pandey, 2000).

El hipocampo es el principal blanco de señales serotoninérgicas aferentes en conjunto con todo el sistema límbico. Las proyecciones serotoninérgicas caudales dorsales provenientes del núcleo de rafe con sus finos axones serotoninérgicos y pequeñas varicosidades están ampliamente distribuidas a lo largo del hipocampo. Esta obvia distribución serotoninérgica hipocampal contribuye a la expresión de los receptores serotoninérgicos (Berumen *et al.*, 2012). No existen estudios similares donde se haya cuantificado la expresión de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de ratas con obesidad inducida por dieta alta en energía por inmunohistoquímica. Los resultados indicaron que en todas las regiones hipocampales para las ratas con una dieta HED hubo MIR significativamente menor en comparación a la dieta CTR. Una posible explicación a este patrón puede basarse en estudios previos donde se han creado ratones con una mutación nula del gen *htr2c* ligada al cromosoma X para el receptor 5-HT<sub>2C</sub>, mostraron un incremento en su masa corporal e hiperfagia (Nonogaki *et al.*, 1998; Tecott, 2007). Además el uso de fármacos agonistas específicos para el receptor como la lorcaserina, reducen el consumo de alimentos en roedores, en una forma consistente con el realce de la saciedad (Halford y Harrold, 2012).

Por su parte, el grupo HED+TRP también mostró una disminución de expresión del receptor 5-HT<sub>2C</sub>, en las zonas C2, CA3 y DG de forma significativa en comparación al grupo CTR+TRP. Es probable que el efecto fisiológico provocado por la dieta HED haya contribuido en mayor grado a la disminución de los receptores en el hipocampo. Sin embargo, se ha demostrado que la mayor disponibilidad de TRP en la dieta conlleva a un incremento en la 5-HT disponible en el hipocampo dorsal (van der Stelt *et al.*, 2004); y posiblemente la mayor

disponibilidad de 5-HT logró reducir el peso corporal activando los receptores 5-HT<sub>2C</sub> e incluso otros subtipos de receptores serotoninérgicos como por ejemplo 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, y 5-HT<sub>4</sub> (Tecott, 2007).

La función de los receptores 5-HT<sub>5A</sub> no se conoce por completo; por lo que no existen reportes que relacionen este tipo de receptor serotoninérgico con la obesidad, sin embargo se ha caracterizado su expresión en el hipocampo, destacando la variabilidad de su expresión durante la ontogenia de la rata (García-Alcocer *et al.*, 2006; García-Alcocer *et al.*, 2010). En este trabajo se encontró una disminución estadísticamente significativa para el giro dentado en el grupo HED con respecto a la dieta control, una posible explicación para este resultado puede estar asociada al hecho que una dieta alta en grasas tiene la capacidad de disminuir hasta en un 40% la neurogénesis en el giro dentado (Lindqvist *et al.*, 2006), implicando una disminución de las neuronas serotoninérgicas o también podría deberse sólo a la disminución del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>5A</sub> en la zona debido a un mecanismo de regulación.

La adición de triptófano provocó que no se encontraran diferencias significativas para la MIR entre los grupos CTR+TRP y HED+TRP. Por lo que la mayor disponibilidad de 5-HT podría estar activando los receptores 5-HT<sub>2C</sub> e incluso otros subtipos de receptores serotoninérgicos como por ejemplo 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, y 5-HT<sub>4</sub> que se encuentran localizados también en el hipocampo (Tecott, 2007), y contribuyen a la disminución del peso corporal de las ratas *Sprague Dawley* con dieta HED+TRP.

En el *western blot* se utilizó como control de carga a la proteína  $\beta$ -actina, que es una de las 6 isoformas que se han encontrado como proteína estructural del citoesqueleto; es utilizada comúnmente como proteína *housekeeping*, al ser un componente básico de las células. Al no encontrarse diferencias significativas entre los grupos se puede decir que se contó con la misma cantidad de proteínas para cada pozo de la electroforesis y los cambios en los receptores son derivados de la

cantidad de receptor presente en el tejido y no por una diferencia en la expresión proteica celular general.

Para el *western blot* del receptor 5-HT<sub>2C</sub>, la proteína presentó un peso molecular de 52 kDa, estos resultados son consistentes con la banda encontrada para el receptor 5-HT<sub>2C</sub> por Yu y Yamaguchi en el cerebro de rata (Yu y Yamaguchi, 2010). La diferencia de expresión del receptor 5-HT<sub>2C</sub> estadísticamente significativa se encontró únicamente para la dieta HED+TRP, sin embargo para el grupo HED no se encontró una diferencia. Al observarse el gráfico se puede apreciar una tendencia a disminuir los receptores para ese grupo. Puede ser el caso que estas variaciones se deban a que el *western blot* no considera individualmente cada una de las regiones hipocámpales, pues detecta el receptor como un todo a diferencia de la inmunohistoquímica donde se sabe que está ocurriendo para cada una de ellas.

El *western blot* del receptor 5-HT<sub>5A</sub>, mostró una banda con un peso molecular cercano a los 40 kDa, por lo que la banda es consistente a la reportada por Bach *et al.*, pues ellos la encontraron con un peso aproximado de 43 kDa en el ratón y ha sido reportado el receptor con un peso de 41 kDa para el humano (Bach *et al.*, 1996; Dutton *et al.*, 2008). No se encontró una diferencia significativa en el grupo HED+TRP con respecto a la dieta CTR+TRP, esto coincide con lo encontrado mediante el método de inmunohistoquímica. Sin embargo, el método de *western blot* no fue lo suficientemente sensible para detectar la disminución de expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> para el grupo HED, pues las células granulares del giro dentado fueron las que tuvieron menos marca inmunorreactiva.

## X. CONCLUSIONES

- Se logró inducir obesidad a ratas *Sprague Dawley* jóvenes mediante una dieta alta en energía (HED).
- Se observó un menor consumo de alimento (g) en los grupos CTR y CTR+TRP.
- Se encontró un menor consumo de agua (mL) para los grupos CTR y CTR+TRP.
- En las mediciones de glucosa a lo largo del tratamiento, no se encontraron cambios significativos.
- En la concentración de colesterol se observó una disminución significativa sólo para el grupo HED+TRP en la última semana de tratamiento
- Se localizó MIR en la membrana de las neuronas para ambos receptores por inmunohistoquímica.
- Se mostró una disminución del receptor 5-HT<sub>2C</sub> para la dieta HED en las regiones CA1, CA2, CA3 y DG.
- Se observó una disminución del receptor 5-HT<sub>2C</sub> para la dieta HED+TRP en las regiones CA2, CA3 y DG.
- Se presentó una disminución del receptor 5-HT<sub>5A</sub> para la dieta HED sólo en el DG.
- El *western blot* mostró una disminución significativa de la expresión de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> para el grupo HED+TRP.

## **PERSPECTIVAS DEL TRABAJO**

Este trabajo servirá de pauta para futuras investigaciones que traten de comprender cuál es la relación entre el hipocampo y los receptores serotoninérgicos en la complicada etiología de la obesidad.

Los resultados aquí observados se basan en un modelo animal relacionado con las condiciones obesogénicas a las cuales está expuesta la población joven, donde el consumo de una dieta alta en energía produce obesidad, pero sobre todo modificaciones a nivel molecular en el encéfalo y más específicamente en el hipocampo, lo cual pudiera asociarse con un déficit de las funciones de esta estructura como la disminución de la memoria y el aprendizaje, mismas que pudieran precisarse en futuras investigaciones. Además es importante realizar nuevas investigaciones para elucidar la función hipocampal de los receptores 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>5A</sub> y las ventajas y desventajas de la participación del triptófano como tratamiento auxiliar para el control de la ingesta de alimentos.

## XI. REFERENCIAS

- Ahima RS. (2011). Digging deeper into obesity. *J Clin Invest.* 121(6): 2076-2079.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008). *Molecular Biology of the Cell.* Editorial Garland Science. 5<sup>a</sup> ed., Estados Unidos. 675-680.
- Alzoubi KH., Aleisa AM., Alkadhi KA. (2005). Impairment of long-term potentiation in the CA1, but not dentate gyrus, of the hippocampus in Obese Zucker rats: role of calcineurin and phosphorylated CaMKII. *J Mol Neurosci.* 27(3): 337-346.
- Archer ZA., Rayner DV., Mercer JG. (2004). Hypothalamic gene expression is altered in underweight but obese juvenile male Sprague-Dawley rats fed a high-energy diet. *J Nutr.* 134(6): 1369-1374.
- Aviram M., Cogan U., Mokady S. (1991). Excessive dietary tryptophan enhances plasma lipid peroxidation in rats. *Atherosclerosis.* 88(1): 29-34.
- Bach M., Sander P., Haase W., Reilander H. (1996). Pharmacological and biochemical characterization of the mouse 5HT5A serotonin receptor heterologously produced in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Receptors Channels.* 4(2): 129-139.
- Banas SM., Rouch C., Kassis N., Markaki EM., Gerozissis K. (2009). A dietary fat excess alters metabolic and neuroendocrine responses before the onset of metabolic diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 29(2): 157-168.
- Barnes NM. (2011). 5-HT: the promiscuous and happy hormone! *Curr Opin Pharmacol.* 11(1): 1-2.
- Barnes NM., SHARP T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology.* 38(8): 1083-1152.

- Barquera S., Campos-Nonato I., Hernández-Barrera L., Flores M., Durazno-Arvizu R., Kanter R., Rival JA. (2009). Obesity and central adiposity in Mexican adults: results from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública Mex.* 51 Suppl 4: S595-S603.
- Benton D., Maconie A., Williams C. (2007). The influence of the glycaemic load of breakfast on the behaviour of children in school. *Physiol Behav.* 92(4): 717-24.
- Berrino F. (2002). Western diet and Alzheimer's disease. *Epidemiol Prev.* 26(3): 107-115.
- Berumen LC., Rodríguez A., Miledi R., García-Alcocer G. (2012). Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal.* 2012: 1-15.
- Bombardi C. (2012). Neuronal localization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor immunoreactivity in the rat hippocampal region. *Brain Res Bull.* 87(2-3): 259-273.
- Boustany CM., Bharadwaj K., Daugherty A., Brown DR., Randall DC., Cassis LA. (2004). Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287(4): R943-R949.
- Burr GO., Burr MM. (1930). On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. *Journal of Biological Chemistry.* 86(2):587-621.
- Byrne R., Roberts J. (2004). *From Molecules to Networks. An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience.* Editorial Elsevier. 1<sup>a</sup> ed., Estados Unidos. 275-281.
- Camilleri M. (2009). Serotonin in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 16(1): 53-59.
- Carr K A., Daniel TO., Lin H., Epstein LH. (2011). Reinforcement pathology and obesity. *Curr Drug Abuse Rev.* 4(3): 190-196.

- Cizza G., Rother KI. (2012). Beyond fast food and slow motion: weighty contributors to the obesity epidemic. *J Endocrinol Invest.* 35(2): 236-242.
- Cooke D., Bloom S. (2006). The obesity pipeline: current strategies in the development of anti-obesity drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 5(11): 919-931.
- Cooper M., Hausman R. (2002). *La Célula*. Editorial Marván. 5<sup>a</sup>ed., México. 541-549.
- Cordain L., Eaton SB., Sebastian A., Mann N., Lindeberg S., Watkins BA., O'Keefe JH., Brand-Miller J. (2005). Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr.* 81(2): 341-354.
- Cornier MA. (2011). Is your brain to blame for weight regain? *Physiol Behav.* 104(4): 608-612.
- Das, UN. (2010). Obesity: genes, brain, gut, and environment. *Nutrition.* 26(5): 459-473.
- Davidson TL., Kanoski SE., Schier LA., Clegg DJ., Benoit SC. (2007). A potential role for the hippocampus in energy intake and body weight regulation. *Curr Opin Pharmacol.* 7(6): 613-616.
- DelParigi A., Chen K., Salbe AD., Hill JO., Wing RR., Reiman EM., Tataranni PA. (2004). Persistence of abnormal neural responses to a meal in postobese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 28(3): 370-377.
- Dennis EA., Dengo AL., Comber DL., Flack KD., Savla J., Davy KP., Davy BM. (2010). Water consumption increases weight loss during a hypocaloric diet intervention in middle-aged and older adults. *Obesity (Silver Spring).* 18(2): 300-307.
- Duncan MJ., Jennes L., Jefferson JB., Brownfield MS. (2000). Localization of serotonin (5A) receptors in discrete regions of the circadian timing system in the Syrian hamster. *Brain Res.* 869(1-2): 178-185.

- Dutton AC., Massoura AN., Dover TJ., Andrews NA., Barnes NM. (2008). Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT<sub>5A</sub> receptor. *Neurochem Int.* 52(3): 419-425.
- Ellacott KL., Halatchev IG., Cone RD. (2006). Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology.* 147(7):3190-3195.
- Escobar G., Diaz-Ricart M., Gomez-Gil E., Serra M., Gasto C., Bozzo J., Galan AM. (2006). Serotonergic mechanisms: a potential link between affective disorders and cardiovascular risk. *Timely Top Med Cardiovasc Dis* 10: E3.
- Eskelinen MH., Ngandu T., Helkala EL., Tuomilehto J., Nissinen A., Soininen H., Kivipelto M. (2008). Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. *Int J Geriatr Psychiatry.* 23(7): 741-747.
- Fargin A., Raymond JR., Lohse MJ., Kobilka BK., Caron MG., Lefkowitz RJ. (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Nature* 335(6188): 358-360.
- Feijo-Fde M., Bertoluci MC., Reis C. (2011). Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. *Rev Assoc Med Bras.* 57(1): 74-77.
- Ferreira AV., Hoffman LC., Schoeman SJ., Sheridan R. (2002). Water intake of Boer goats and Mutton merinos receiving either a low or high energy feedlot diet. *Small Ruminant Research.* 43(3): 245-248.
- Frassetto A., Zhang J., Lao JZ., White A., Metzger JM., Fong TM., Chen RZ. (2008). Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT<sub>6</sub> receptor. *Brain Res.* 1236: 140-144.
- García-Alcocer G., Rodríguez A., Moreno-Layseca P., Berumen LC., Escobar J. & Miledi R. (2010). Serotonin receptor 5-HT<sub>5A</sub> in rat hippocampus decrease by leptin treatment. *Neurosci Lett.* 486(3): 171-173.

- García-Alcocer G., Segura LC., García-Peña M., Martínez-Torres A., Miledil R. (2006). Ontogenetic distribution of 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> receptors in the rat hippocampus. *Gene Expr.* 13(1): 53-57.
- Garfield AS., Heisler LK. (2009). Pharmacological targeting of the serotonergic system for the treatment of obesity. *J Physiol.* 587(1): 49-60.
- Gershon MD. (2009). Enteric serotonergic neurones ... finally! *J Physiol* 587(3): 507.
- Gibson CD., Carnell S., Ochner CN., Geliebter A. (2010). Neuroimaging, gut peptides and obesity: novel studies of the neurobiology of appetite. *J Neuroendocrinol.* 22(8): 833-845.
- González-Rico J., Vásquez-Garibay E., Cabrera-Pivaral C., González-Pérez G. (2012). La disfunción familiar. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 50(2): 127-134.
- Graeff FG., Guimaraes FS., De-Andrade TG., Deakin JF. (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 5(1): 129-141.
- Grillo CA., Piroli GG., Junor L., Wilson SP., Mott DD., Wilson MA., Reagan LP. (2011). Obesity/hyperleptinemic phenotype impairs structural and functional plasticity in the rat hippocampus. *Physiol Behav.* 105(1): 138-144.
- Gutiérrez J., Rivera-Dommarco J., Shamah-Levy T., Villalpando-Hernández S., Franco A., Cuevas-Nasu L., Romero-Martínez M., Hernández-Ávila M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. In: PÚBLICA, I. N. D. S. (ed.). Cuernavaca, México.
- Haahr ME., Rasmussen PM., Madsen K., Marnier L., Ratner C., Gillings N., Baare WF., Knudsen GM. (2012). Obesity is associated with high serotonin 4 receptor availability in the brain reward circuitry. *Neuroimage.* 61(4): 884-888.
- Halford JC., Harrold JA. (2012). 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists and the control of appetite. *Handb Exp Pharmacol.* 209: 349-356.
- Hensler JG. (2006). Serotonergic modulation of the limbic system. *Neurosci Biobehav Rev.* 30(2): 203-414.

- Herrera BM., Keildson S., Lindgren CM. (2011). Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*. 69(1): 41-49.
- Herrick-Davis K., Grinde E., Harrigan TJ., Mazurkiewicz JE. (2005). Inhibition of serotonin 5-hydroxytryptamine<sub>2c</sub> receptor function through heterodimerization: receptor dimers bind two molecules of ligand and one G-protein. *J Biol Chem*. 280(48): 40144-40151.
- Iniesta I. (2012). On the origin of Ammon's horn. *Neurología*. 1-7.
- Inubushi T., Kamemura N., Oda M., Sakurai J., Nakaya Y., Harada N., Suenaga M., Matsunaga Y., Ishidoh K., Katunuma N. (2012). L-tryptophan suppresses rise in blood glucose and preserves insulin secretion in type-2 diabetes mellitus rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 58(6): 415-422.
- Jonnakuty C., Gragnoli C. (2008). What do we know about serotonin? *J Cell Physiol*. 217(2): 301-306.
- Kanasaki K., Koya D. (2011). Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol*. 2011: 197636.
- Kandel E. (2005). Eric Kandel: the future of memory. *Mol Interv*, 5(2): 65-69.
- Kanoski SE., Davidson TL. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*. 103(1): 59-68.
- Kanoski SE., Meisel RL., Mullins AJ., Davidson TL. (2007). The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res*. 182(1): 57-66.
- Kanoski SE., Zhang Y., Zheng W., Davidson TL. (2010). The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimers Dis*. 21(1): 207-219.

- Kawada T., Hagihara K., Iwai K. (1986). Effects of capsaicin on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *J Nutr.* 116(7): 1272-1278.
- Kim GW., Lin JE., Valentino MA., Colón-González F., Waldman SA. (2011). Regulation of appetite to treat obesity. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 4(2): 243-259.
- Kolb B., Whishaw I. (2009). *Neuropsicología humana*. Editorial Médica Panamericana. 5ª ed., España. 112.
- Koolman J., Röhm K. (2004). *Bioquímica texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana 3ª ed., Alemania. 354-355.
- Kumar V., Abbas A., Fausto N., Mitchell R. (2008). *Patología Humana* Editorial Elsevier Saunders. 8ª ed España. 100-130.
- Lam DD., Przydzial MJ., Ridley SH., Yeo GS., Rochford JJ., O'Rahilly S., Heisler LK. (2008). Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology.* 149(3): 1323-1328.
- Lindqvist A., Mohapel P., Bouter B., Frielingsdor H., Pizzo D., Brundin P., Erlanson-Albertsson C. (2006). High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *Eur J Neurol.* 13(12): 1385-1388.
- López-Alarcón M., Rodríguez-Cruz M. (2008). Epidemiología y genética del sobrepeso y la obesidad. Perspectiva de México en el contexto mundial. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 65: 421–430.
- Mattes RD. (2010). Hunger and thirst: issues in measurement and prediction of eating and drinking. *Physiol Behav.* 100(1): 22-32.
- Meguid MM., Ramos EJ., Suzuki S., Xu Y., George ZM., Das UN., Hughes K., Quinn R., Chen C., Marx W., Cunningham PR. (2004). A surgical rat model of human Roux-en-Y gastric bypass. *J Gastrointest Surg.* 8(5): 621-630.

- Mela V., Llorente-Berzal A., Díaz F., Argente J., Viveros MP., Chowen JA. (2012). Maternal deprivation exacerbates the response to a high fat diet in a sexually dimorphic manner. *PLoS One*. 7(11): 1-13.
- Minor RK., Chang JW., De-Cabo R. (2009). Hungry for life: How the arcuate nucleus and neuropeptide Y may play a critical role in mediating the benefits of calorie restriction. *Mol Cell Endocrinol*. 299(1): 79-88.
- Molliver ME. (1987). Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function. *J Clin Psychopharmacol*. 7(6):3S-23S.
- Moreno-López L., Soriano-Mas C., Delgado-Rico E., Rio-Valle JS., Verdejo-García A. (2012). Brain structural correlates of reward sensitivity and impulsivity in adolescents with normal and excess weight. *PLoS One*. 7(11): 1-8.
- Mueller K., Sacher J., Arelin K., Holiga S., Kratzsch J., Villringer A., Schroeter ML. (2012). Overweight and obesity are associated with neuronal injury in the human cerebellum and hippocampus in young adults: a combined MRI, serum marker and gene expression study. *Transl Psychiatry*. 2: 1-7.
- Nguyen DM., El-Serag HB. (2010). The epidemiology of obesity. *Gastroenterol Clin North Am*. 39(1): 1-7.
- Nichols DE., Nichols CD. (2008). Serotonin receptors. *Chem Rev*. 108(5): 1614-1641.
- Niculescu MD., Lupu DS. (2009). High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*. 27(7): 627-633.
- Nonogaki K., Strack AM., Dallman MF., Tecott L.H. (1998). Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Nat Med*. 4(10): 1152-1156.
- Noristani HN., Verkhatsky A., Rodríguez JJ. (2012). High tryptophan diet reduces CA1 intraneuronal beta-amyloid in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 11(5): 810-822.

- OMS. (2014). Obesidad y sobrepeso. Página web. Consultado 01/mar/14. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> 2014].
- Papanikolaou Y., Palmer H., Binns MA., Jenkins DJ., Greenwood CE. (2006). Better cognitive performance following a low-glycaemic-index compared with a high-glycaemic-index carbohydrate meal in adults with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 49(5); 855-862.
- Pasinetti GM., Eberstein JA. (2008). Metabolic syndrome and the role of dietary lifestyles in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 106(4): 1503-1514.
- Peña A. (2010). ¿Cómo funciona la célula? *Fisiología Celular*. Editorial Conaculta. 3ª ed México. 127-129.
- Perera TD., Lu D., Thirumangalakudi L., Smith EL., Yaretskiy A., Rosenblum LA., Kral JG. Coplan JD. (2011). Correlations between hippocampal neurogenesis and metabolic indices in adult nonhuman primates. *Neural Plast*. 2011: 1-6.
- Purves D., Augustine G., Fitzpatrick D., Katz L., Lamantia A., Mcnamara J., Williams M. (2004). *Neuroscience*. Editorial Sinauer Associates. 3ª ed Estados Unidos. 129-181.
- Rapport MM., Green AA., Page IH. (1948). Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*. 176(3): 1243-1251.
- Rees S., deen-Daas I., Foord S., Goodson S., Bull D., Kilpatrick G., Lee M. (1994). Cloning and characterisation of the human 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor. *FEBS Lett*. 355(3): 242-246.
- Ricci MR., Levin BE. (2003). Ontogeny of diet-induced obesity in selectively bred Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285(3): R610-R618.
- Sanger GJ., Hellstrom PM., Naslund E. (2010). The hungry stomach: physiology, disease, and drug development opportunities. *Front Pharmacol*. 1: 145.

- Sargent BJ., Henderson AJ. (2011). Targeting 5-HT receptors for the treatment of obesity. *Curr Opin Pharmacol.* 11(1): 52-58.
- Schwartz GJ. (2000). The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition.* 16: 866-873.
- Stranahan AM., Norman ED., Lee K., Cutler RG., Telljohann RS., Egan JM., Mattson MP. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus.* 18(10):1085-1088.
- Tecott LH. (2007). Serotonin and the orchestration of energy balance. *Cell Metab.* 6(5): 352-361.
- Van der-Stelt HM., Broersen LM., Olivier B., Westenberg HG. (2004). Effects of dietary tryptophan variations on extracellular serotonin in the dorsal hippocampus of rats. *Psychopharmacology (Berl).* 172(2): 137-144.
- Villalobos-Comparán M., Flores-Dorantes MT., Villarreal-Molina MT., Rodríguez-Cruz M., García-Ulloa AC., Robles L., Huertas-Vázquez A., Saucedo-Villarreal N., López-Alarcón M., Sánchez-Muñoz F., Domínguez-López A., Gutiérrez-Aguilar R., Menjivar M., Coral-Vázquez R., Hernández-Stengele G., Vital-Reyes VS., Acuna-Alonzo V., Romero-Hidalgo S., Ruiz-Gómez DG., Riano-Barros D., Herrera MF., Gómez-Pérez FJ., Froguel P., García-García E., Tusie-Luna MT., Aguilar-Salinas CA., Canizales-Quinteros S. (2008). The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity (Silver Spring).* 16(10): 2296-2301.
- Villalobos-Comparán M., Villamil-Ramírez H., Villarreal-Molina T., Larrieta-Carrasco E., León-Mimila P., Romero-Hidalgo S., Jacobo-Albavera L., Liciega-Fuentes AE., Campos-Pérez FJ., López-Contreras BE., Tusie-Luna T., Del Rio-Navarro BE., Aguilar-Salinas CA., Canizales-Quinteros S. (2012). PCSK1 rs6232 is associated with childhood and adult class III obesity in the Mexican population. *PLoS One.* 7(6): 1-5.

- Voigt JP., Schade R., Fink H., Hortnagl H. (2002). Role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the control of food intake in obese Zucker rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav.* 72(1-2): 403-409.
- Winocur G., Greenwood CE., Piroli GG., Grillo CA., Reznikov LR., Reagan LP., Mcewen BS. (2005). Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci.* 119(5): 1389-1395.
- Xu T., Pandey SC. (2000). Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull.* 51(6): 499-505.
- Yu HJ., Yamaguchi A. (2010). Endogenous serotonin acts on 5-HT<sub>2C</sub>-like receptors in key vocal areas of the brain stem to initiate vocalizations in *Xenopus laevis*. *J Neurophysiol.* 103(2): 648-658.
- Yu JH., Kim MS. (2012). Molecular mechanisms of appetite regulation. *Diabetes Metab J.* 36(6): 391-398.
- Zhang Y., Smith EM., Baye TM., Eckert JV., Abraham LJ., Moses EK., Kissebah AH., Martin LJ., Olivier M. (2010). Serotonin (5-HT) receptor 5A sequence variants affect human plasma triglyceride levels. *Physiol Genomics.* 42(2): 168-176.
- Zhou L., Sutton GM., Rochford JJ., Semple RK., Lam DD., Oksanen LJ., Thornton-Jones ZD., Clifton PG., Yueh CY., Evans ML., McCrimmon RJ., Elmquist JK., Butler AA; Heisler LK. (2007). Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways. *Cell Metab.* 6(5): 398-405.

## XII. APENDICE

En este apéndice se presentan las abreviaturas utilizadas a lo largo del texto

5-hidroxi-L-triptófano	5-HTP	Giro dentado	DG
Ácido gamma-aminobutírico	GABA	Índice de masa corporal	IMC
Álbumina de suero bovino	BSA	Kilodaltons	kDa
Análisis de varianza	ANOVA	Marca inmunorreactiva	MIR
Área lateral hipotálmica	LHA	Neuropéptido Y	NPY
Área ventral tegmental	VTA	Núcleo arcuato	ARC
Buffer de fosfato	PBS	Núcleo del tracto solitario	NTS
Buffer de fosfato con tritón	PBT	Núcleo dorsomedial	DMN
Cuerno de Amón	CA	Núcleo paraventricular	PVN
Diaminobencidina	DAB	Núcleo ventromedial	VMN
Dieta alta en energía	HED	Organización Mundial de la Salud	OMS
Dieta alta en energía suplementada con triptófano	HED+TRP	Péptido relacionado agouti	AgRP
Dieta alta en grasas	HF	P-formaldehído	PFA
Dieta control	CTR	Polimorfismos de un solo nucleótido	SNP
Dieta control suplementada con triptófano	CTR+TRP	Potenciación a largo plazo	LTP
Diodo emisor de luz	DEL	Señal de transducción activada del transcripto 3	STAT3
Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	ENSANUT	Serotonina	5-HT
Error estándar	SEM	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina	CART
Gen asociado a la masa grasa y la obesidad	FTO	Triptófano	TRP

