

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

“EFECTO DE LA 1,3,7-TRIMETILXANTINA EN LA EXPRESIÓN
GÉNICA Y DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES A
ADENOSINA EN HIPOTÁLAMO DE RATA CON OBESIDAD
INDUCIDA POR DIETA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. DAVID ORLANDO GONZÁLEZ MENDOZA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

QUERÉTARO

CENTRO UNIVERSITARIO

NOVIEMBRE DEL 2016

MÉXICO



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

**"EFECTO DE LA 1,3,7-METILXANTINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA Y
DISTRIBUCIÓN DE LOS RECEPTORES A ADENOSINA EN
HIPOTÁLAMO DE RATA 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. David Orlando González Mendoza

Dirigido por:

Dra. Guadalupe García Alcocer

SINODALES

Dra. Guadalupe García Alcocer
Presidente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Secretario

Dra. Edith Garay Rojas
Vocal

Dra. Juan Carlos Solís
Sinodal

M. en C. Karla Magarita Padilla Olvera
Sinodal

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Nombre y Firma

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

Nombre y Firma

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

La obesidad en la actualidad es un problema de índole mundial, para cuyo abordaje se han propuesto alternativas tanto en sistema periférico como en sistema nervioso central. Los receptores a adenosina han demostrado su capacidad regulatoria del tejido adiposo, en acciones metabólicas que ayudan en el problema de la obesidad. Sin embargo, son poco conocidas las implicaciones a nivel de sistema nervioso central en esta patología. Hasta el momento no existen pocos reportes sobre la implicación de los receptores purinérgicos en el sistema nervioso central en la obesidad. Con el fin de determinar el posible rol de los receptores a adenosina A1 y A2A en la obesidad, se generó un modelo de obesidad en rata con una dieta alta en grasas suplementada y no suplementada con 1,3,7-trimetilxantina. En este modelo se evaluó la expresión génica y proteica de los receptores A1 y A2A en el hipotálamo de rata además se determinó el efecto de la 1,3,7-trimetilxantina en los grupos de ratas a evaluar. La expresión génica fue evaluada mediante qPCR, la expresión y distribución proteica por inmunohistoquímica de fluorescencia y para el análisis estadístico se realizó un análisis de ANOVA de dos vías con *post hoc* de Tukey para determinar si existen diferencias significativas. Los datos arrojados mostraron que los receptores modifican su expresión tanto por la dieta como por el consumo crónico de cafeína en el hipotálamo de las ratas.

Palabras clave: A1, A2A, dieta alta en grasas, hipotálamo, obesidad, receptores purinérgicos.

ABSTRACT

Nowadays obesity is a worldwide problem, alternatives have been sought for its approach in peripheral and central nervous system. The adenosine receptors have demonstrated their regulatory capacity in metabolic actions of the adipose tissue that could help in the obesity problem, however in central nervous system there are no evidences about their implication for these reasons in this work we evaluated the genomic and proteomic analysis expression of adenosine A1 and A2a receptors in obese rat hypothalamus, in order to determinate a possible implication in this disease, was evaluated the effect of 1,3,7-trimethylxanthine in the rats groups. For this goal was generated an obesity rat model with a high fat diet, supplemented and not with 1,3,7-trimethylxanthine, and was studied the A1 and A2 purinergic receptors genes in the hypothalamus in a control and obese group by qPCR. The receptor distributions for those receptors were also studied by immunohistochemistry and the results were statistical analyzed by a two way ANOVA statistical analysis and a post hoc test.

Key words: A₁, A_{2a}, high fat diet, hypothalamus, obesity, purinergic receptors

DEDICATORIAS

A mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta y porque el orgullo que sienten por mí, fue lo que me hizo ir hasta el final. Va por ustedes, por lo que valen, porque admiro su fortaleza y por lo que han hecho de mí, porque de forma resumida son mi ejemplo y los quiero mucho.

A mis hermanas, que supieron entenderme aun cuando no estuve con ustedes, a esas dos pequeñas que quiero mucho, Paola y Kenya y sin olvidar a la nueva integrante de la familia, Fernanda mi sobrina/ahijada. Sigán adelante y cumplan sus sueños.

Por último pero no por eso menos importante a cada uno de mis amigos, a ellos que estuvieron conmigo cuando más los necesite, que me sacaron una sonrisa en momentos difíciles, los que han perdurado desde la licenciatura y los nuevos que hice en este camino, gracias por todo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades que me otorgo durante mi formación académica, 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 FOMIX-M0016-2014-03 250289 y FOFI UAQ FC201605

Agradezco infinitamente a la Dra. Guadalupe García Alcocer por su apoyo en la realización de esta tesis, por su guía, paciencia y dedicación que mostro durante mi estancia en el posgrado.

Por último y no por ello menos importante agradecer a cada uno de mis sinodales: a la Dra. Laura Berumen, Dra. Edith Garay, M. en C. Karla Padilla Olvera y al Dr. Juan Carlos Solís, por el tiempo que dedicaron a la revisión de mi tesis y sus contribuciones en cada uno de mis exámenes tutorales, por darse un espacio a pesar de sus múltiples ocupaciones.

Mil palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, su comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

Contenido	Página
RESUMEN	I
SUMMARY	II
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Obesidad	2
2.2. Estadísticas de obesidad	3
2.2.1. Estadísticas de obesidad en México	5
2.3. Tratamientos para la obesidad	7
2.4. ¿Por qué desarrollamos obesidad?	9
2.5. Hipotálamo y obesidad	11
2.6. Receptores Purinérgicos	12
2.6.1. Receptores a adenosina	14
2.6.1.1 Receptores A ₁	16
2.6.1.1.1. Mecanismo de acción	17
2.6.1.1.1.1 Vía de señalización canónica	17
2.6.1.1.1.2 Vía de señalización no canónica	18
2.6.1.1.2 Distribución de receptores A ₁ en cerebro	19
2.6.1.2. Receptores a adenosina A _{2A}	20
2.6.1.2.1. Mecanismo de acción	21
2.6.1.3. Receptores a adenosina y obesidad	23
2.7. Generalidades de las metilxantinas	25
2.7.1. 1,3,7-Trimetilxantina y obesidad	27

2.8. Modulación de los receptores a adenosina	28
3. JUSTIFICACIÓN	30
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	31
5. HIPÓTESIS	31
6. OBJETIVOS	32
5.1 General	32
5.2 Específicos	32
6. METODOLOGÍA	33
6.1. Reactivos	33
6.2. Materiales	33
6.3. Equipos	34
6.4. Diseño experimental	34
6.5. Inducción de obesidad	35
6.6 Parámetros bioquímicos	36
6.7 Inmunohistoquímica	36
6.7.1. Extracción de encéfalo v	36
6.7.2. Preparación y fijación de tejido	36
6.7.3. Cortes de tejido	36
6.7.4. Inmunohistoquímica	36
6.78 RT-PCR en tiempo real	37
6.7.1. Extracción de ARN total	37
6.7.2. Síntesis de cDNA	37
6.8. PCR en tiempo real	37
6.8.1. Extracción de RNA	37
6.8.2 Síntesis de cDNA	38
6.8.3 PCR en tiempo real	39
6.8.4 Cuantificación relativa	39
6.9. Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
8. DISCUSIÓN	53
9. CONCLUSIONES	61

10. LITERATURA CITADA	63
ANEXO 1	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad.	7
2	Descripción de los grupos del diseño experimental	29
3	Primers para la PCR en tiempo real	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribución del estado nutricional de hombres y mujeres adultos de México	3
2	Prevalencia de obesidad en adultos	5
3	Interacción de los órganos periféricos con el sistema nervioso central para la regulación de la homeostasis energética	8
4	Clasificación de los receptores purinérgicos	10
5	Receptores purinérgicos y sus ligandos	11
6	Proteínas implicadas en la regulación extracelular de los niveles de adenosina	12
7	Vías de señalización de los receptores a adenosina	13
8	Principales funciones de los receptores a adenosina A ₁	14
9	Mecanismo de acción de los receptores a adenosina A ₁	16
10	Distribución del mRNA del receptor A ₁ en SNC y sistema periférico	17 18
12	Localización del receptor a adenosina A _{2A} , función en el tejido o célula y posible aplicación terapéutica.	19
13	Principales vías de señalización del receptor A _{2A}	22
14	Vías de señalización implicadas en la regulación de SERT mediadas por A ₃	23

1. INTRODUCCIÓN

La obesidad está definida por la OMS como una acumulación anormal o excesiva de grasa, que puede ser perjudicial para la salud; en la actualidad es un problema de índole mundial. En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en el 2012, reportó que el 26.8% de los hombres y el 37.5% de las mujeres mayores de 20 años padecen obesidad.

El abordaje de esta enfermedad esta principalmente enfocado en medidas preventivas como el ejercicio y la dieta, sin embargo, no todas las personas son capaces de responder fisiológicamente a estos cuidados, siendo por ello que se buscan alternativas farmacológicas para poder abordar el problema. El criterio de evaluación para el tratamiento farmacológico es estipulado por la FDA (Food and Drug Administration), hasta el 2010 solo dos fármacos se prescribían para el tratamiento de la obesidad, el orlistat y la sibutramina, ambos con buenos resultados en la disminución del peso corporal.

Los estudios respecto a los receptores purinérgicos y la obesidad se han enfocado o han sido encaminados en su mayoría a los efectos en sistema periférico, principalmente tejido adiposo, pero poco se ha estudiado en sistema nervioso central. Los receptores purinérgicos, haciendo énfasis en los de adenosina han sido evaluados en estados de respuesta al grado de alimentación, por ejemplo, el receptor A_1 se ha encontrado que en un modelo animal con dieta restringida, aumenta su expresión en hipotálamo, el principal regulador de apetito, por lo que se sugiere su papel en esta estructura cerebral. Es por eso que en este trabajo se evaluó la expresión de dos de los receptores a adenosina (A_1 y A_{2A}) en el hipotálamo, en un estado de obesidad en ratas, para determinar su posible participación a este nivel en ese estado patológico, y poder ver en un futuro su posible aplicación para abordar la enfermedad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Obesidad

De acuerdo a la OMS, la obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Es por ello que esta organización se encargó de desarrollar un sistema de clasificación, para discrepar entre una persona obesa o con sobrepeso; esta clasificación está basada en el índice de masa corporal (IMC), que es un indicador de la relación entre el peso y la estatura.

El IMC se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2), con base en esta clasificación tenemos que un IMC igual o superior a 25 determina sobrepeso, mientras que un IMC igual o superior a 30 determina obesidad. Esta herramienta resulta ser muy útil para la clasificación, ya que proporciona una medida más útil del sobrepeso y la obesidad en la población, siendo la misma para ambos sexos y para los adultos de todas las edades (OMS, 2014).

La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad, es un desequilibrio energético entre calorías consumidas y gastadas, el cual es producido por un aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos que son ricos en grasa, sal y azúcares, pero pobres en vitaminas, minerales y otros micronutrientes; además de un descenso en la actividad física, como resultado de la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, de los nuevos modos de desplazamiento y de una creciente urbanización.

La sociedad ha sido influenciada por mercadotecnia de empresas dedicadas al desarrollo de alimentos, empresas que se encuentran enfocadas en la producción de comida rápida, algunos con contenidos energéticos muy altos, lo que repercute en cambios en el metabolismo de las personas y que encamina la generación de ambientes obesogénicos.

Los cambios en los hábitos de alimentación y la actividad física son a menudo consecuencia de cambios ambientales y sociales asociados al desarrollo y a la falta de políticas de apoyo en sectores como la salud, agricultura, transporte, planeamiento urbano, medio ambiente, procesamiento, distribución y comercialización de alimentos y educación.

La obesidad está asociada con una variedad de enfermedades que incluyen, dislipidemias, hipertensión, accidente cerebrovascular, diabetes y ciertos tipos de cáncer. Además, una condición crónica tal como artritis, apnea y problemas en vesícula biliar también se han relacionado con obesidad. Se ha demostrado que una ligera pérdida de peso (5-10%) en una persona con obesidad, puede conducir a mejoras en los riesgos de las enfermedades asociadas a esta enfermedad (Bray y Ryan 2014).

2.1.2. Estadísticas de obesidad

La obesidad ha incrementado su incidencia en todos los países. En el 2014, 39% de las personas mayores a 18 años (38% de hombres y 40% de mujeres) presentaron sobrepeso. La prevalencia de la obesidad en todo el mundo se duplicó entre los años de 1980 y 2014. En el 2014, 11% de los hombres y 15% de las mujeres en todo el mundo fueron obesos. De este modo, más de medio millón de adultos en todo el mundo son clasificados como obesos.

Estimaciones estandarizadas por edad sobre la prevalencia de la obesidad en hombres y mujeres de edades comprendidas de 18 años y más, se muestran en las figuras 1 y 2 respectivamente. La prevalencia de sobrepeso y obesidad es mayor en las regiones de América (61% de sobrepeso u obesidad en ambos sexos, y 27% de obesidad). Presentándose además una tendencia en la cual se observa que las mujeres presentan mayor índice de obesidad que los hombres.

En México de acuerdo a estas estadísticas, más del 25% de mujeres presentan obesidad, mientras que los hombres presentan porcentajes menores que van del 15-24.9%, siendo estas cifras realmente alarmantes (OMS, 2014).

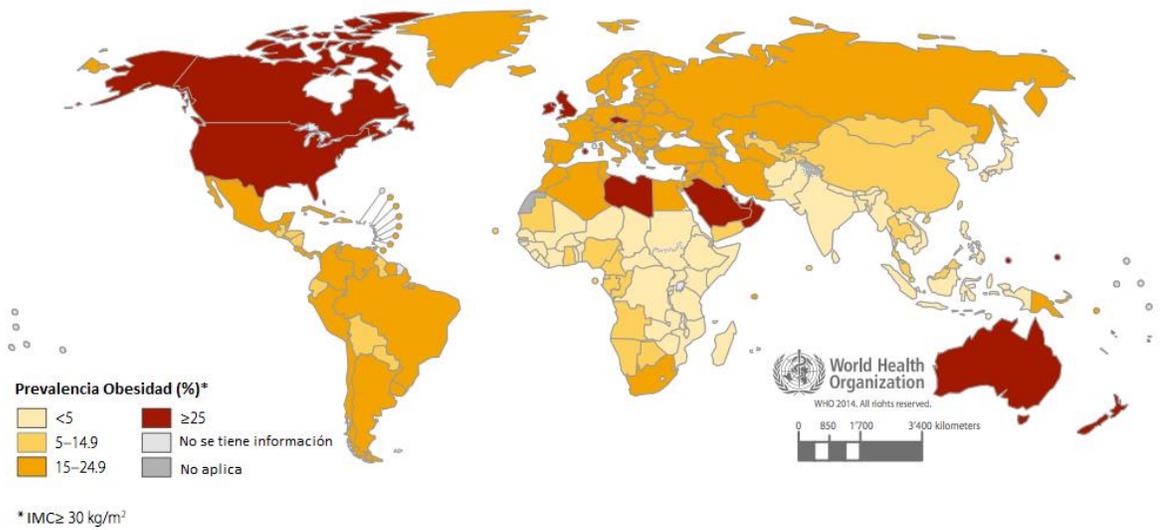


Figura 1. Prevalencia de obesidad en el mundo de hombres mayores a 18 años con un IMC ≥ 30 kg/m², 2014.

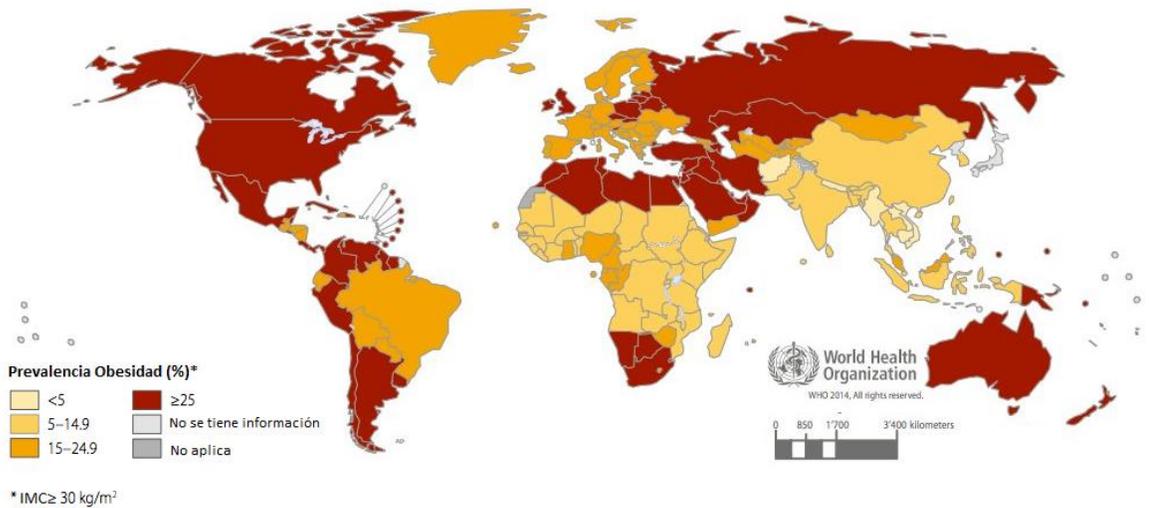


Figura 2. Prevalencia de obesidad en el mundo de mujeres mayores a 18 años con un IMC ≥ 30 kg/m², 2014.

2.2. Estadísticas de obesidad en México

México está inmerso en un proceso de transición, donde la población experimenta un aumento inusitado de IMC excesivo (sobrepeso y obesidad) que afecta a las zonas urbanas y rurales, a todas las edades y a las diferentes regiones. Los aumentos en las prevalencias de obesidad en México se encuentran entre los más rápidos documentados en el plano mundial. De 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2% (Figura 3).

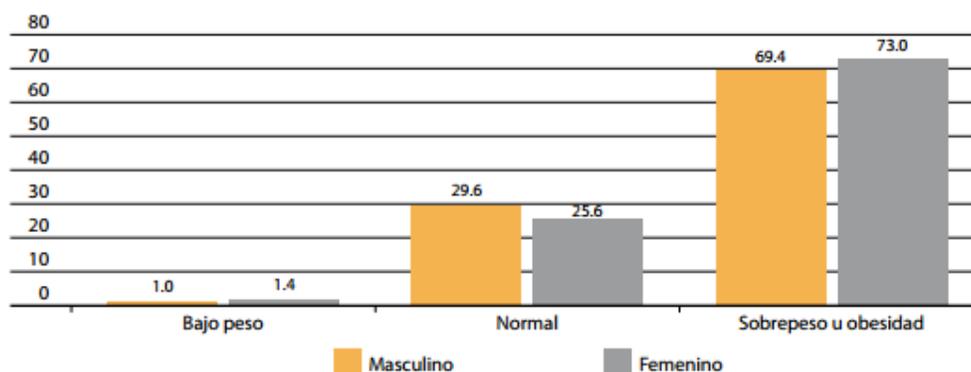


Figura 3. Distribución del estado nutricional de hombres y mujeres adultos de México, de acuerdo a la clasificación del IMC establecido por la OMS. México ENSANUT 2012.

En el último periodo de evaluación (de acuerdo a ENSANUT de 2006 a 2012), la prevalencia agregada de sobrepeso y obesidad en adultos ha mostrado una reducción en la velocidad de aumento que era cercana al 2% anual (en el período 2000-2006) para ubicarse en un nivel inferior al 0.35% anual (Gutiérrez y col., 2012).

Después de aumentos rápidos en la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad, se ha observado una menor aceleración en el porcentaje relativo de

aumento entre los años 2006 y 2012. A nivel mundial se han propuesto diversas explicaciones sobre este fenómeno entre las principales destacan las siguientes: a) equilibrio de saturación: existe un porcentaje de la población con alta susceptibilidad a desarrollar peso excesivo (por razones genéticas), que constituye el techo de la prevalencia, al que se está llegando ya en la población mexicana, b) efecto de intervenciones: los factores de riesgo inmediatos (ingestión de energía o actividad física) se han modificado promoviendo la acumulación de tejido adiposo en las personas. Es importante mencionar que la prevalencia de obesidad en México se encuentra entre las más altas del mundo, de acuerdo a la OECD (por sus siglas en inglés. The Organization for Economic Co-operation and Development) ocupando el segundo lugar a nivel mundial, siendo el primer lugar Estados Unidos (OECD, 2014).

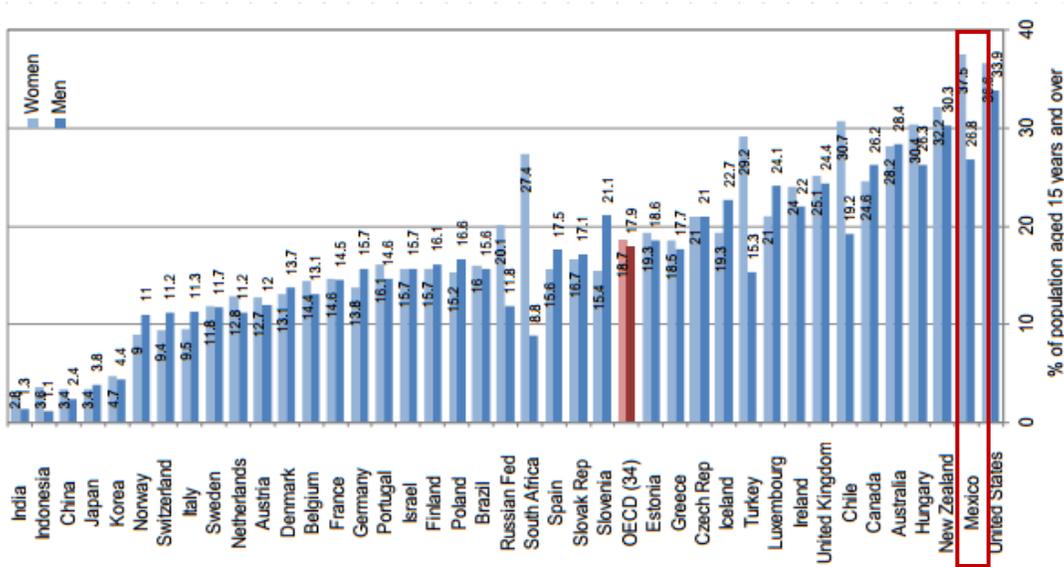


Figura 4. Prevalencia de obesidad en adultos en el 2012 (Modificado de OECD 2014).

2.3. Tratamientos para la obesidad

La obesidad a nivel mundial ha tenido tal impacto que ha generado que se lleven a cabo medidas de prevención, para evitar riesgos derivados de este estado patológico, las principales medidas son, dieta y ejercicio (NOM-008-SSA3-2010), pero el problema ante estas medidas es que no toda la población es capaz de responder fisiológicamente, por lo que se necesita la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos, que puedan proveer un mecanismo efectivo para la pérdida de peso.

El criterio de evaluación para un tratamiento farmacológico efectivo está estipulado por la FDA (*Food and Drug Administration*) y la NICE (*National Institute Health and Clinical Excellence*), hasta el 2010, solo dos fármacos se prescribían para el tratamiento de la obesidad, el orlistat y la sibutramina. Estos fármacos tienen mecanismos de acción completamente diferentes, pero mostraron disminuir de manera eficaz el peso corporal en conjunto con cambios en la alimentación y la actividad física.

El mecanismo de acción del orlistat es la disminución de la absorción de grasas, inhibiendo la lipasa pancreática y gástrica en la luz intestinal. Esta inhibición no permite que los triglicéridos se degraden a ácidos grasos libres y puedan ser absorbidos por el epitelio y posteriormente utilizados. Se ha demostrado mediante estudios doble ciego que el orlistat puede disminuir 3% del peso corporal en 52 semanas (Davidson MH y col. 1999).

Por otra parte, la sibutramina, fue suspendida en el mismo año por la agencia reguladora de fármacos de la unión Europea, por presentar efectos secundarios severos a nivel cardiovascular, sin embargo, la FDA permitió la venta para otros países que no corresponden a la unión Europea. Este fármaco actúa inhibiendo la recaptura de monoaminas y es considerada una de las drogas más prescritas para el tratamiento de la depresión, mostrando además del efecto antidepresivo, una disminución de peso corporal por reducción de ingesta de alimentos.

La lorcaserina es otro medicamento potencial para el tratamiento de la obesidad, actúa en el sistema serotoninérgico central, reduciendo la ingesta de comida y el peso corporal, actuando como un agonista selectivo de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} teniendo efecto directo a nivel de hipotálamo (Bello y Liang, 2011).

En el cuadro 1 se muestran los fármacos aprobados por la FDA, dosis y mecanismo de acción.

Cuadro 1. Fármacos aprobados por la FDA para la disminución de peso
(Modificado de George y Donna, 2014)

Nombre genérico y año de aprobación	Nombre comercial	Dosis
Inhibidores de la lipasa pancreática aprobados por la FDA		
Orlistat, 1999	Xenical	120mg tres veces al día antes de la comida
Orlistat, 2007	Alli	60mg tres veces al día antes de la comida
Agonistas de los receptores 5-HT_{2C} aprobados por la FDA		
Lorcaserin, 2012	Belviq	10mg dos veces al día
Inhibidores de la recaptura de 5-HT (Antidepresivo)		
Fluoxetina	Reductil	-----
Drogas noradrenérgicas aprobadas por la FDA		
Fentamina, 1959	Tenuate	25mg tres veces al día
Fendimetrazina , 1959	Bontril	17.5-70mg tres veces al día

2.4. ¿Por qué desarrollamos obesidad?

La obesidad se genera principalmente porque existe un desequilibrio en la homeostasis energética, es decir, un aumento en la cantidad de energía consumida comparada con la cantidad de energía gastada. Cuando presentamos un equilibrio en el consumo y gasto energético, tenemos un estado metabólico óptimo; sin embargo, cuando rompemos con este equilibrio, el cuerpo empieza a almacenar tejido adiposo, no solo a nivel abdominal, sino también en otros órganos, como lo son: páncreas, hígado y riñón, que nos lleva a un desorden metabólico y al desarrollo de enfermedades secundarias a la obesidad (Figura 5) (Velloso, 2011).



Figura 5. Esquema que representa el desequilibrio energético (Modificado de Velloso, 2011)

La homeostasis energética es considerada como el equilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético; es un proceso altamente sensible regulado por el sistema nervioso central (SNC), principalmente el hipotálamo. Esta homeostasis esta mediada por las entradas nutricionales, humorales y nerviosas en un sistema cerebro-periferia (Figura 6) (Buckman y Ellacott, 2014). La información sobre el estado de energía está integrado por los núcleos hipotalámicos y el tronco cerebral, y es transmitida a otros circuitos neuronales tales como la vía dopaminérgica mesolímbica. Hasta la fecha, la gran mayoría de las investigaciones sobre la regulación hipotalámica de la homeostasis de la energía, se ha centrado en la participación de la señalización neuronal con la contribución de otros tipos de células.

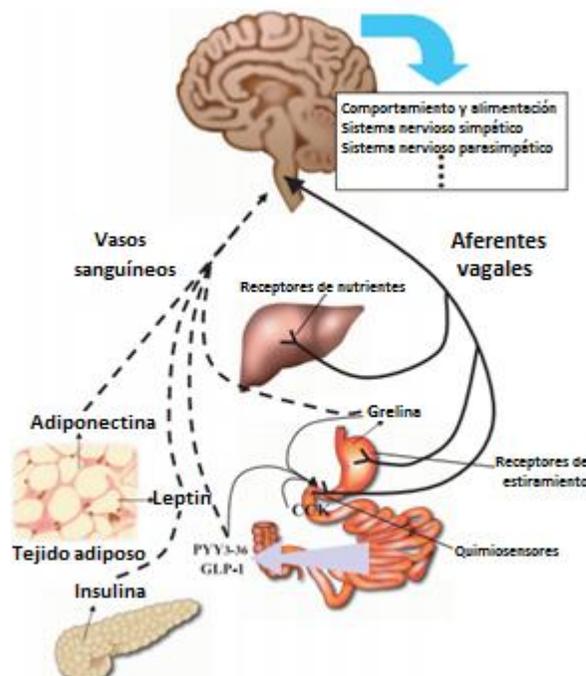


Figura 6. Interacción de los órganos periféricos con el sistema nervioso central para la regulación de la homeostasis (Modificado de Buckman y Ellacott,2014).

2.5. Hipotálamo y obesidad

El hipotálamo consiste en una población heterogénea de núcleos, que son responsables de mantener la homeostasis corporal. Estudios genéticos y farmacológicos han identificado circuitos neuronales hipotalámicos, que juegan un papel importante en las señales que integran el consumo de alimentos y el gasto energético (Buckman y Ellacott, 2014). Esta homeostasis está derivada principalmente de la regulación en dos áreas hipotalámicas conocidas como: a) el centro de saciedad que es el área ventromedial, sensible a leptina circulante y que contiene neuronas sensibles a glucosa, inhibiendo así la alimentación, y b) el centro de alimentación clásica que es denominado como área lateral está relacionada con aspectos motivacionales de alimentación inducidos por hipoglucemia y sensible a la acción del neuropeptido Y.

Por lo tanto el hipotálamo está relacionado con la obesidad, principalmente por la regulación de la ingesta de alimentos, función que está regulada por múltiples receptores como el de serotonina, el receptor de melanocortina y receptores a glutamato, entre otros.

Después de la ganancia de peso debido a una exposición alta en grasas, el impacto sobre la homeostasis energética puede ser medida determinando si existen cambios en “puntos específicos” en vías de señalización en el tejido analizado, ya que se ha demostrado que el aumento en el tejido adiposo en modelos experimentales genera cambios en la actividad hipotalámica. Por ejemplo, se ha demostrado que en ratas obesas, existe un aumento en la expresión del neuropeptido Y, estos cambios en la expresión de genes proveen información valiosa de funcionalidad y organización del sistema energético homeostático (Archer y col., 2005). Otra prueba de estos cambios son los canales de potasio sensibles a ATP, los cuales en ratas con obesidad inducida por dieta reducen su expresión en neuronas hipotalámicas (Spanswick, 2000), teniendo así dos de muchos ejemplos, que demuestran como la obesidad puede cambiar la función neuronal.

En los últimos años se ha buscado la presencia de un tipo de receptores denominados, receptores purinérgicos, los cuales tienen niveles de expresión elevados en el sistema nervioso central, además de que en el hipotálamo ya se ha descrito la expresión de algunos receptores de este tipo.

2.6. Receptores Purinérgicos

Las primeras evidencias de la participación de las purinas en la señalización extracelular datan desde principios del siglo pasado, cuando Drury y Szent-Gyorgyi en 1929 demostraron que la adenosina y ácidos adenílicos (AMP, ADP y ATP) extraídos del músculo cardíaco, producían diversos efectos biológicos como la dilatación arterial o la disminución de la presión sanguínea. Poco después, se sospechó que la adenosina y el ATP debían actuar a través de receptores diferentes. Más adelante, se describieron las acciones extracelulares de estos compuestos en otros tejidos, destacando sus efectos sobre la motilidad intestinal y la contracción uterina (Burnstock, 2007).

Las acciones del ATP, pronto se extendieron al sistema nervioso. En los años cincuenta, el grupo de Holton propuso al ATP como la sustancia vasodilatadora que se liberaba tras la estimulación de los nervios sensoriales del conejo (Holton, 1959). Al principio de la década de los 60, se detectaron en el sistema nervioso autónomo respuestas postsinápticas bajo el estímulo de antagonistas colinérgicos y adrenérgicos, lo que llevó a postular la existencia de nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC). Posteriormente, Burnstock propuso que dicho efector era el ATP, introduciendo el nombre de nervios purinérgicos y sugiriendo la existencia de una neurotransmisión purinérgica (Burnstock y cols., 1970; Burnstock, 1972). Durante mucho tiempo, estos conceptos no fueron plenamente aceptados. Sin embargo, en los años siguientes, se acumularon evidencias que apoyaban esta hipótesis.

En la actualidad se tienen ya establecidos los receptores en los cuales actúan las purinas, que son denominados receptores purinérgicos. Estos receptores son una gran familia que incluye receptores de tipo ionotrópicos (P2X) y metabotrópicos

(P1 y P2Y), la figura 7 esquematiza la clasificación de los receptores purinérgicos y su actividad derivada de la proteína G a la cual están acoplados (Burnstock, 2014).

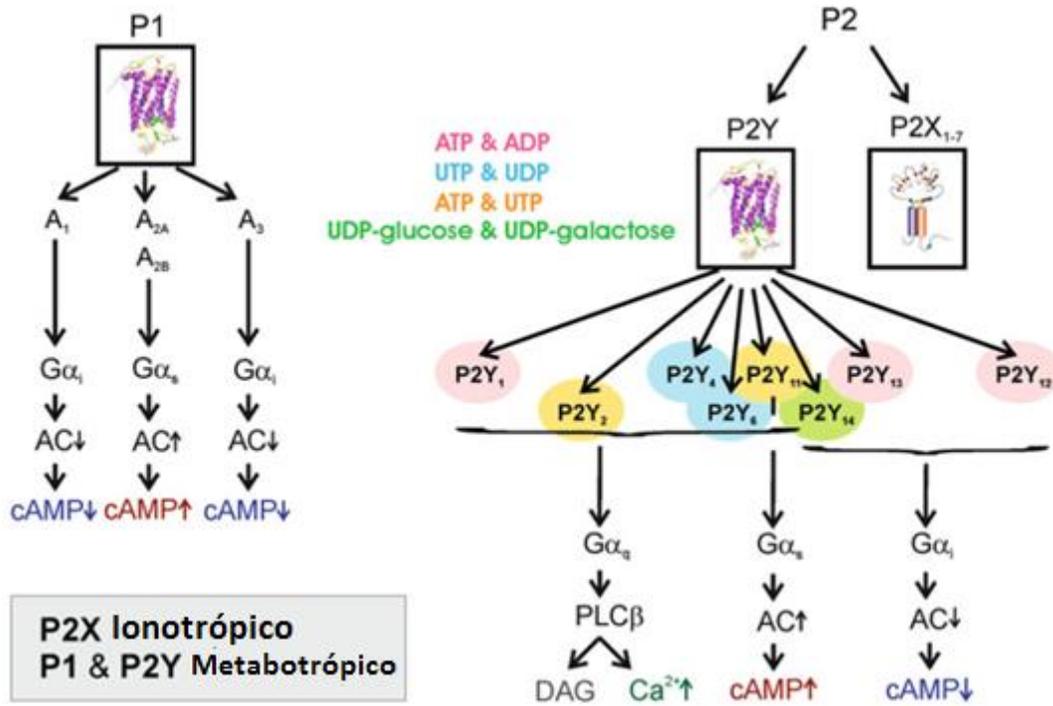


Figura 7. Clasificación de los receptores purinérgicos.

(Modificado de Burnstock, 2014)

Cada uno de estos receptores tendrá una purina o ácido adenílico como ligando, el ATP permitirá la activación de los receptores P2X y P2Y, mientras que ADP actuará solo sobre los receptores P2Y y la adenosina sobre los receptores P1 (Figura 8) (Zimmermann y col., 2012).

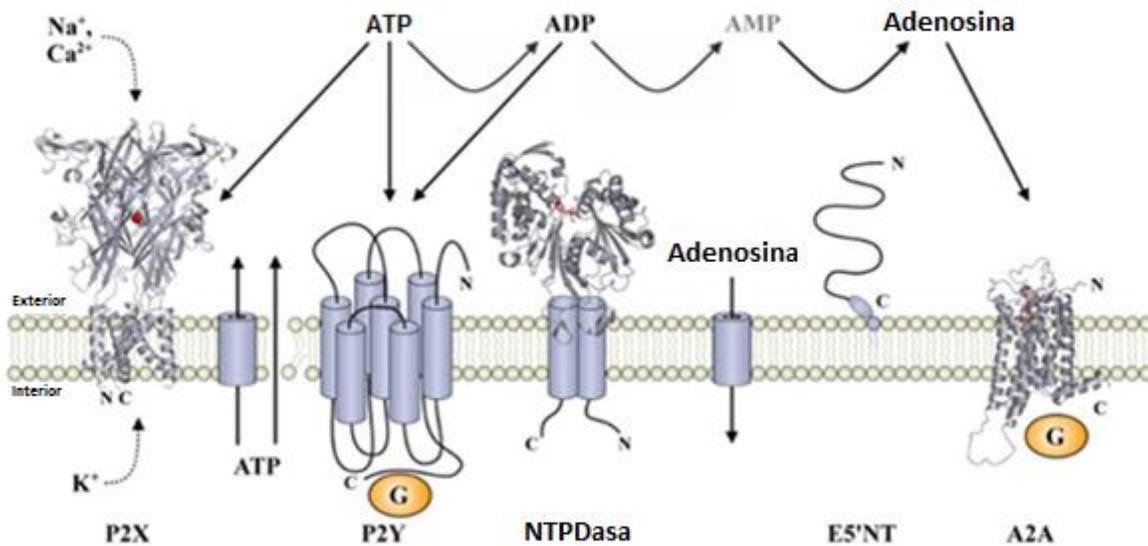


Figura 8. Receptores purinérgicos y sus ligandos (Modificado de Zimmermann y col. 2012)

2.6.1. Receptores a adenosina

En el cerebro, la adenosina no actúa como un neurotransmisor clásico, es decir, no es almacenada en vesículas y después liberada en respuesta a un cambio de potencial, sino que es generada intracelularmente como un metabolito intermediario de la síntesis de ácidos nucleicos y ATP. También es posible obtener adenosina derivada del ATP ya producido, este proceso se lleva a cabo por enzimas denominadas ectonucleotidasas (CD73 y CD39) encontradas extracelularmente, proceso que se esquematiza en la figura 6 (Chen y col., 2014).

La adenosina extracelular ejerce efectos fisiológicos y farmacológicos actuando en 4 tipos de receptores altamente conservados y farmacológicamente bien caracterizados denominados receptores de adenosina, dicha familia consta de los receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 (Fredholm y col., 2001), todos son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs por sus siglas en inglés) (Kenneth A. y Zhan-Guo, 2006). Los efectos de la adenosina dependen de la concentración que tenga en el lugar donde ejercerá su efecto, así como de los niveles de expresión de cada uno de los receptores en un tipo celular o región en el

cerebro. Los receptores A₁ y A₃ son receptores acoplados a proteínas G_i, por lo que inhiben la formación de AMPc y estimulan canales de K⁺; el receptor A_{2A} esta acoplado a proteínas G_s, mientras que el receptor A_{2B} logra acoplarse a más proteínas G incluyendo G_s, G_q y G₁₂ ambos estimulando la producción de AMPc (Figura 9) (Fredholm y col., 2011).

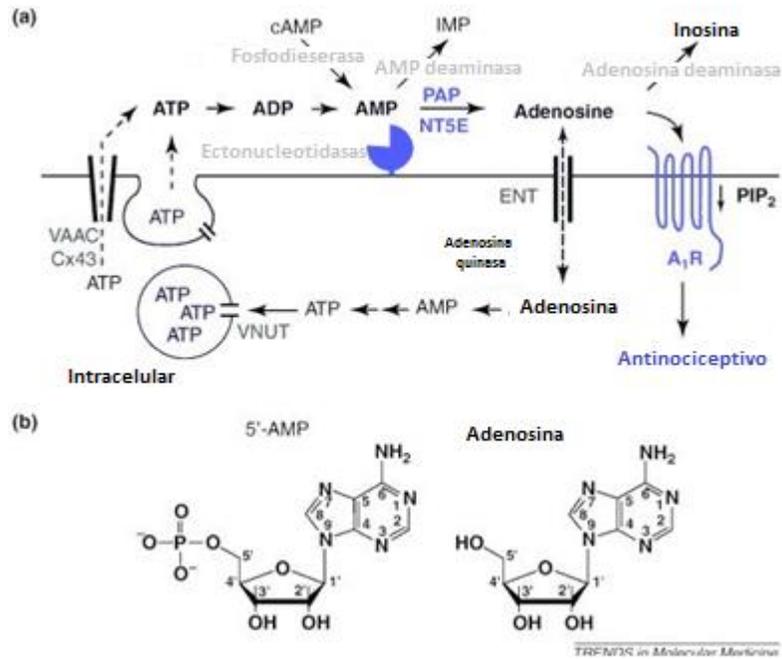


Figura 9. Proteínas implicadas en la regulación extracelular de los niveles de adenosina (Modificado de Chen y col., 2014).

Estos receptores están implicados en una variedad de funciones, tanto fisiológicas y patológicas, que van desde la actividad motora, regulación del sueño, cognición, angiogénesis, procesos inflamatorios, isquemia y desórdenes neurodegenerativos.

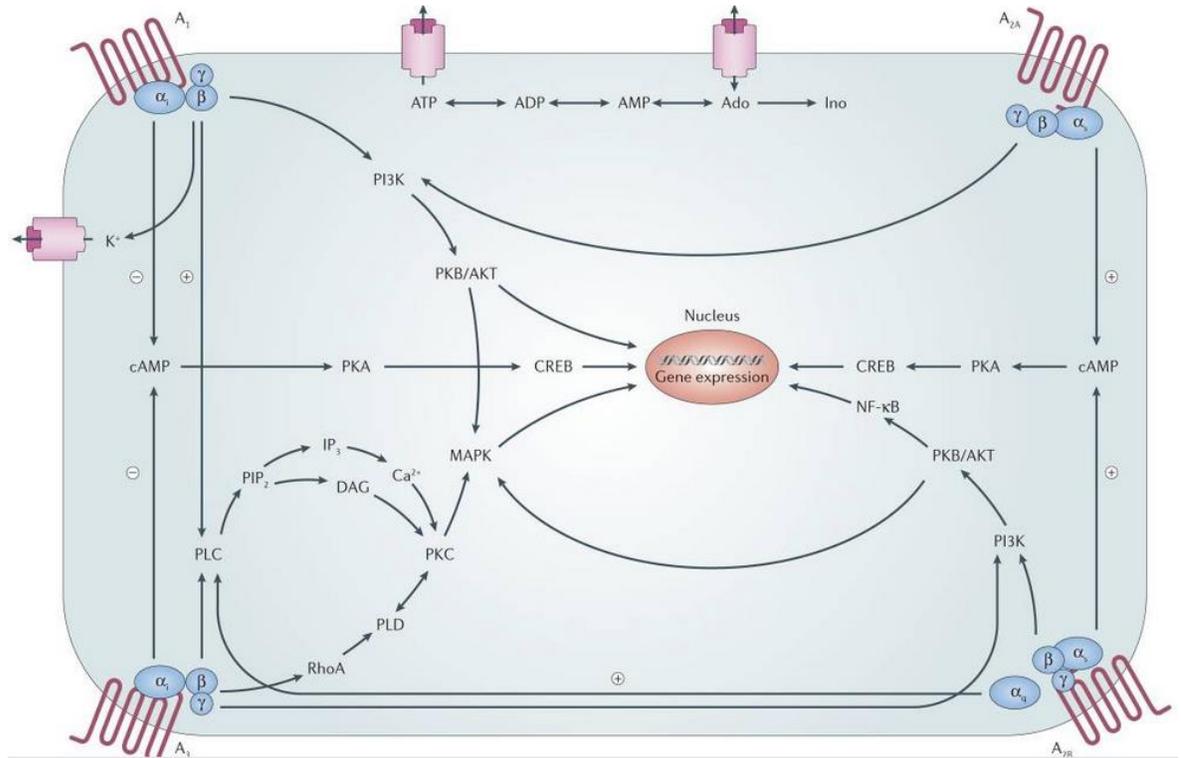


Figura 10. Vías de señalización de los receptores a adenosina (Kenneth y Zhan-Guo, 2006).

2.6.1.1. Receptores A₁

El receptor a adenosina A₁ es el subtipo más estudiado de estos receptores y ha sido ampliamente caracterizado en múltiples órganos, siendo su acción primaria la regulación de ritmo y contractilidad cardíaca, liberación de neurotransmisor, lipólisis y función renal. Este receptor acoplado a proteína G_i, regulando adenilato ciclasa, quinasas y algunos canales iónicos (ej. potasio), juega un papel importante en muchas funciones celulares, teniendo como resultado final diversas acciones, dependiendo del tejido en el cual se está expresando. En la figura 11 se muestra el efecto que implica la activación de estos receptores en diversos tejidos.

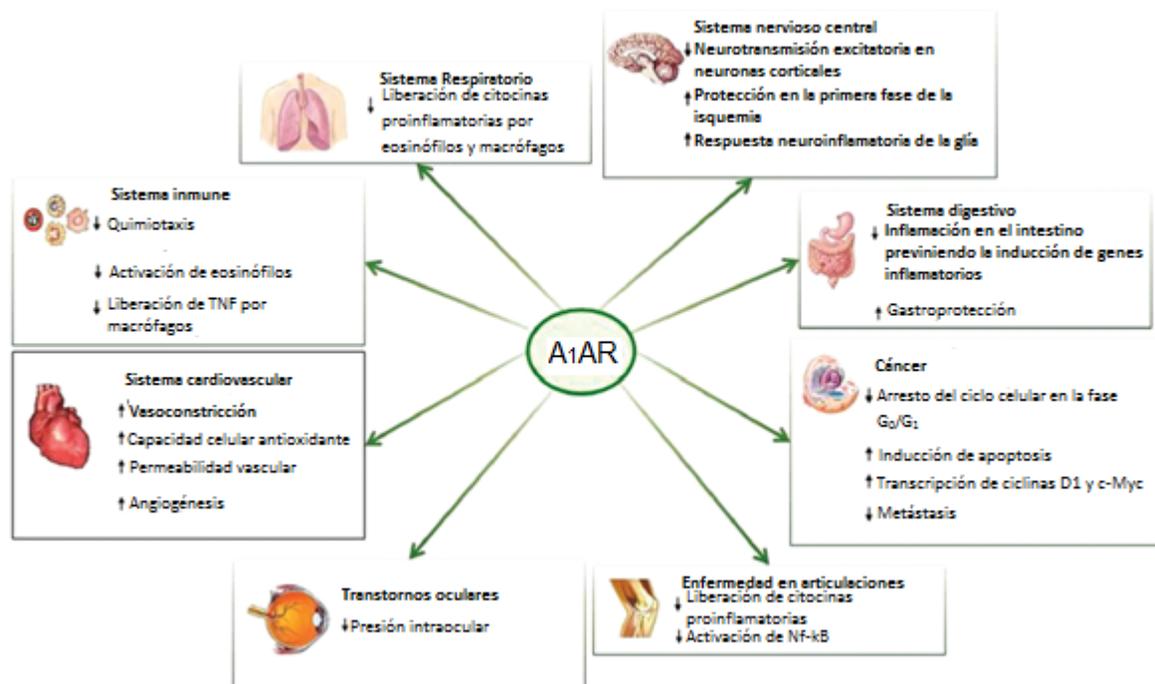


Figura 11. Diagrama que esquematiza las principales funciones de los receptores A₁

2.6.1.1.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del receptor A₁ se encuentra mediado por dos tipos de vías de señalización, una canónica y otra no canónica, entendiéndose como vía canónica, aquella que se desencadena por la unión directa del ligando y que es la respuesta principal ante tal estímulo, y la no canónica es aquella vía que implica la regulación del receptor, por ejemplo, la internalización o desensibilización y que no está implicada con las principales vías de señalización establecidas para el receptor.

2.6.1.1.1.1. Vía de señalización canónica

El receptor A₁ se expresa en múltiples tejidos incluyendo el cerebro y presenta una afinidad relativamente alta para la adenosina (Fredholm y col. 2001). Existe una amplia evidencia de que una porción significativa de la función de adenosina en cerebro es mediada por el receptor A₁. En la actualidad se ha demostrado que las

vías de señalización funcionales del receptor, son derivadas de su acoplamiento a proteínas G. El receptor A_1 está acoplado a una proteína G inhibitoria. La estimulación de A_1 promueve la inhibición de adenilato ciclasa y por lo tanto una disminución en la producción de AMPc el cual se sabe inhibe la PKA dependiente de AMPc en las neuronas, puede regular la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos. (Nabekura y Akaike, 2003). Otros blancos río abajo de Gai incluye canales de K^+ (Kirsch y col, 1990) y canales de Ca^{2+} (Liu y Gao, 2007). Es importante destacar que, la estimulación de A_1 puede activar la vía de fosfolipasa C (PLC), derivada de la liberación de los dímeros de $G\beta\gamma$, en varios tipos celulares (Doddi y Dobson, 2010). Por otra parte, la vía de señalización de PLC/PKC, puede ser activada por el receptor A_1 vía $G_{\alpha 16}$, en células de linfoblastoma humano y células HEK293 (Liu y Wong, 2004).

Vía de señalización no canónica

Similar a muchos otros receptores acoplados a proteínas G, la desensibilización funcional del receptor A_1 está mediada por quinasas de GPCR y arrestina. La estimulación de A_1 induce un rápido reclutamiento de β -arrestina 1, a la membrana plasmática y la posterior activación de ERK1/2, seguido por una baja en la regulación del receptor A_1 (Jajoo y col., 2010). No existen ligandos selectivos para la vía independiente de proteína G del receptor A_1 , que se hayan desarrollado con éxito (Langemeijer y col., 2013).

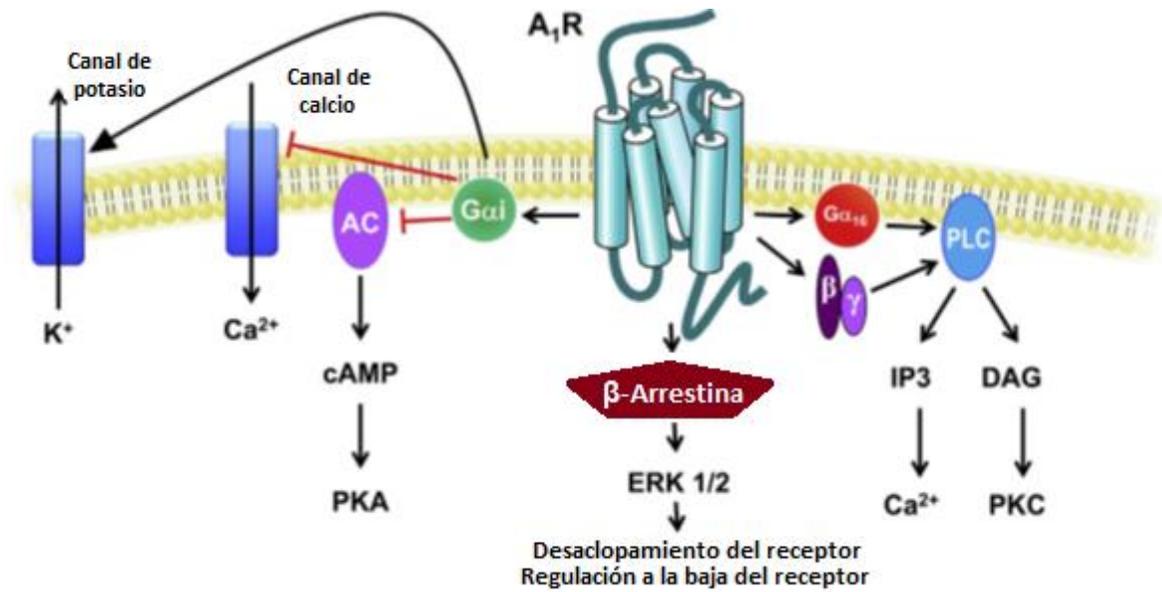


Figura 12. Mecanismo de acción del receptor a adenosina A₁. Principales vías de activación (Modificado de Fredholm y col. 2001).

2.6.1.1.2. Distribución de receptores purinérgicos A₁ en cerebro

El receptor A₁ se expresa en todo el organismo humano con niveles elevados en cerebro, notablemente en neuronas de corteza, hipocampo, hipotálamo y cerebelo, además se sabe que se encuentra en medula espinal. (Dixon y col., 1996; Fredholm y col., 2001; Mahan y col., 1991). En el cerebro se encuentra distribuido tanto en neuronas post sinápticas como presinápticas (Rebola y col., 2003). Además se encuentra ampliamente distribuido en hipotálamo en la región anterior en el núcleo supraóptico y supraquiasmático, en la región media en el área lateral y la región posterior en el núcleo posterior.

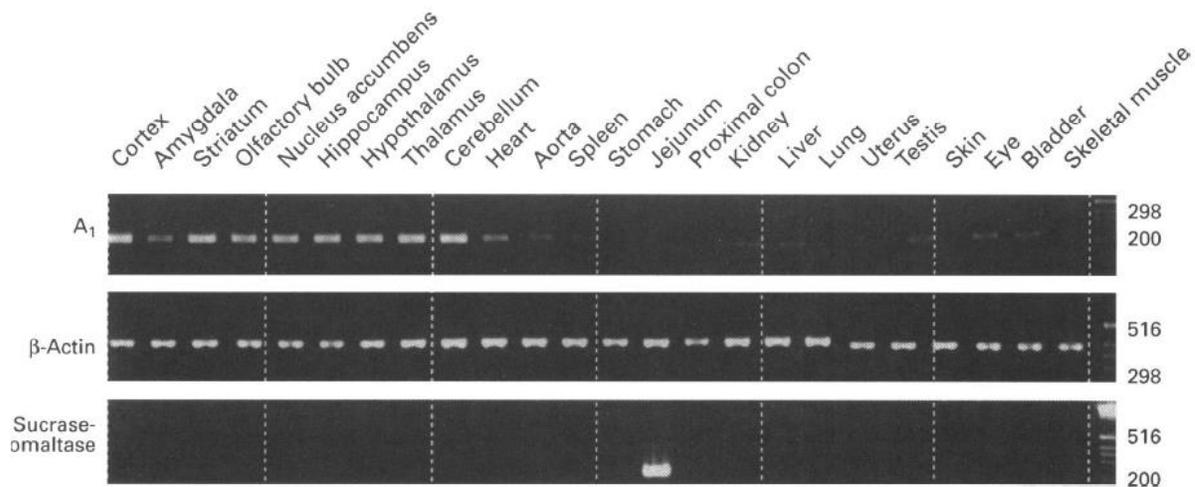


Figura 13. Distribución del mRNA del receptor A₁ (Modificado de Dixon y col. 1996)

2.6.1.2. Receptores a adenosina A_{2A}

El receptor a adenosina A_{2A} se expresa ampliamente en bazo, timo, leucocitos, plaquetas, neuronas GABAérgicas y algunas regiones del cerebro. Las acciones del receptor A_{2A} son diversas, ya que se ha encontrado co-localizado y físicamente asociado a otros receptores acoplados a proteínas G, formando heterodímeros, por ejemplo con el receptor de dopamina (D₃/A_{2A}), con el receptor canabinoide (CB₁/A_{2A}) y con el de glutamato (mGluR₅/A_{2A}).

El receptor A_{2A} es importante en la regulación de la vasodilatación, síntesis de nuevos vasos capilares y protección de tejidos ante daños colaterales inflamatorios, además, se ha encontrado que puede modular la liberación de citocinas, mientras que a nivel cerebral, se asociado principalmente con las enfermedades de parkinson, depresión y alzheimer (Figura 11).

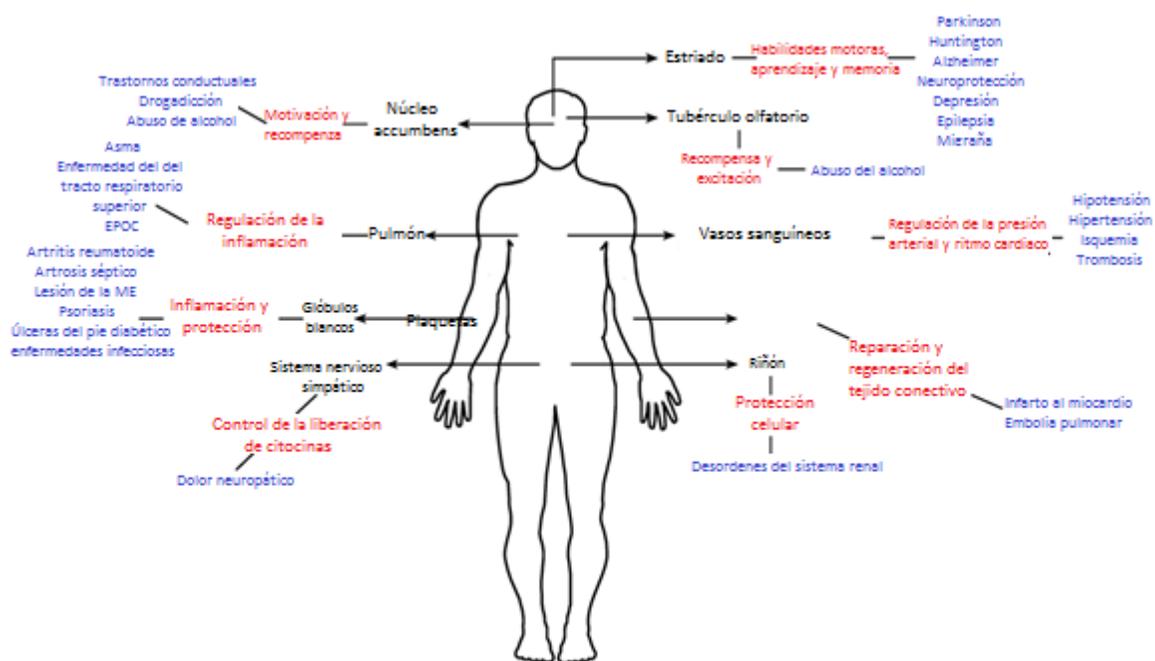


Figura 14. Localización del receptor a adenosina A_{2A} (negro), función en el tejido o célula (rojo) y posible aplicación terapéutica (azul) (Modificado de Lera y col., 2013).

2.6.1.2.1. Mecanismo de acción

El receptor A_{2A}, es un receptor acoplado a proteína G (GPCR por sus siglas en inglés) el cual tiene una afinidad alta por adenosina comparado con los otros receptores. (Frendholm y col., 2001). Es bien sabido que la vía de señalización del receptor A_{2A}, está dada por la activación de cAMP/PKA, debido a que está acoplado a una subunidad G_{as} (Chen y col., 2014). La elevación de cAMP conduce a la activación de PKA y múltiples blancos río abajo, incluyendo el factor de transcripción CREB. La fosforilación de CREB mediante PKA, promueve una crítica plasticidad y supervivencia neuronal (Waltereit y Weller, 2013). Debido a que CREB es el punto de convergencia de MAPK y PKA, la estimulación del receptor A_{2A} conduce a la activación de CREB y rescata el deterioro del crecimiento de neuritas, causada por la obstrucción de MAPK en células PC12 (Cheng y Chern, 2002). Adicionalmente para CREB, la activación de PKA aumenta la actividad de

muchas quinasas. Por ejemplo, la estimulación de A_{2A} desencadena la vía de Src/Ras/Raf-1/MEK/ERK dependiente de PKA (Fredholm, 2001) (Figura 12).

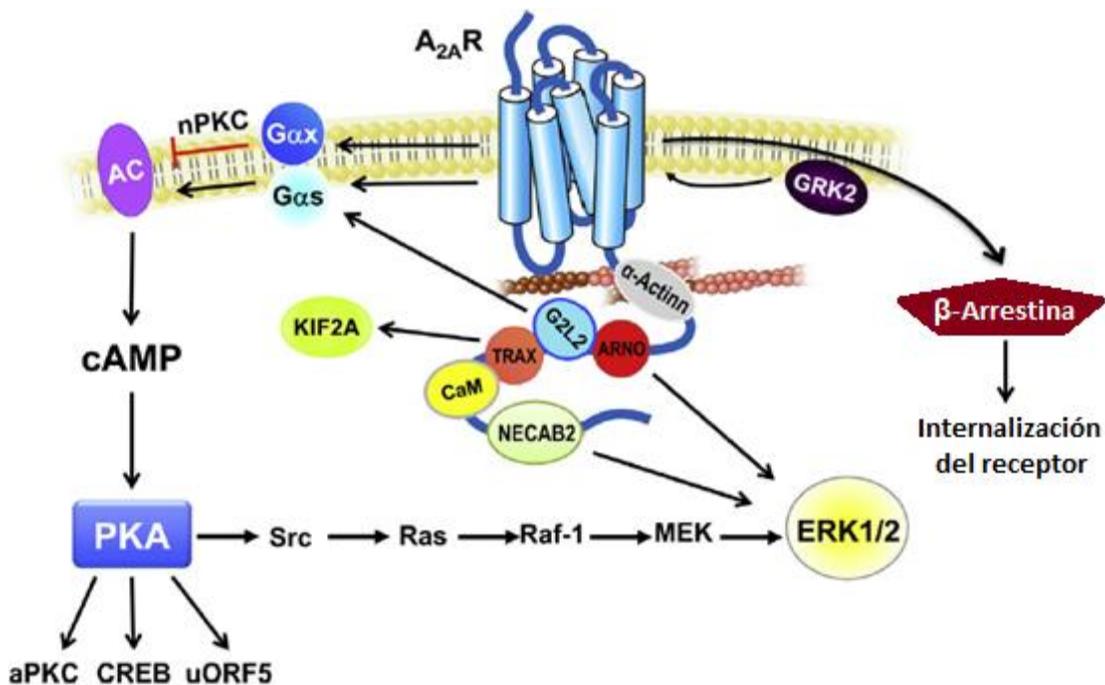


Figura 15. Principales vías de señalización del receptor A_{2A} (Modificado de Fredholm y col. 2001).

2.6.1.2.1.1. Distribución de receptores purinérgicos A_{2A} en cerebro

El receptor A_{2A} se encuentra altamente expresado en cerebro, principalmente se encuentra concentrado en el estriado dorsal y ventral, así como en el tubérculo olfatorio (Robeva y col., 1998). El receptor A_{2A} se expresa también, pero en niveles bajos, en hipocampo, corteza cerebral e hipotálamo, estas últimas evidencias están sustentadas por estudios con inmunohistoquímica (Zhan y col., 2013). En cerebro este receptor se encuentra principalmente en neuronas postsinápticas en el estriado, pero en estructuras como el hipocampo e hipotálamo existe una elevada expresión en neuronas presinápticas (Rebola y col., 2005).

La expresión del receptor A_{2A} es susceptible a cambios, derivados de procesos de hipoxia, así como de daños en algunas regiones del cerebro que generan un marcado aumento en la regulación de este receptor, daños tales como: administración de intraperitoneal de kainato, ratas con diabetes inducida por estreptozotocina y ratas de edad avanzada (Chen y col., 2014).

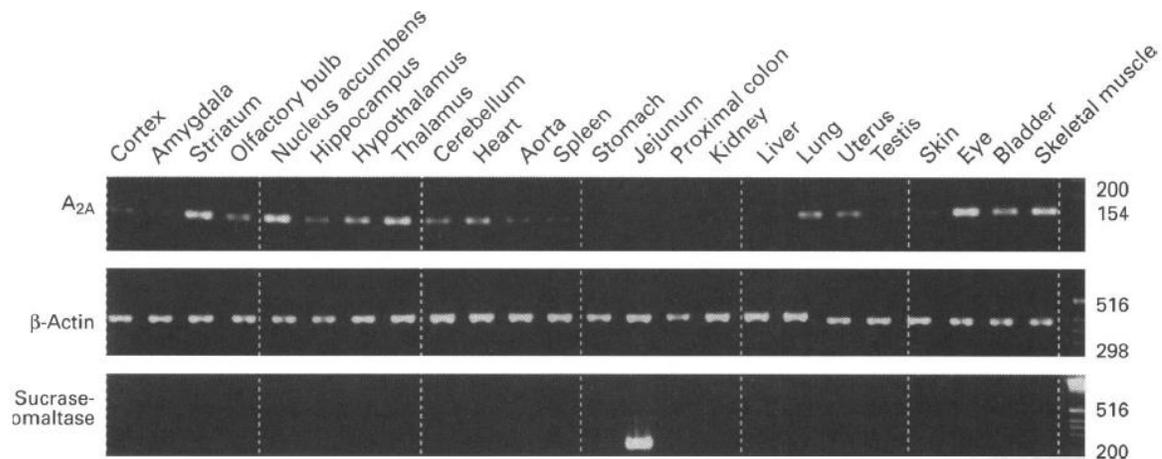


Figura 16. Distribución del mRNA del receptor A_{2A} (Modificado de Dixon y col.1996)

2.6.1.3. Receptores a adenosina y obesidad.

Los estudios de los receptores a adenosina y obesidad están principalmente enfocados en sistema periférico, sobre todo en tejido adiposo, ya que se ha demostrado que este tipo celular expresa estos receptores. Gharibi y colaboradores en 2012, demostraron que la adenosina exógena puede estimular adipogénesis de proosteoblastos y preadipocitos por activación de A₁. Por otro lado, el receptor A_{2B} genera una inhibición de lipogénesis y adipogénesis, esto sugiere que el antagonismo del receptor A₁ y la activación de A_{2B} podrían ser considerados como una terapia adicional, para el manejo de enfermedades relacionadas con la obesidad.

El receptor A₁ es capaz de responder a cambios en la alimentación, se ha demostrado que en una dieta restringida, en hipotálamo, este receptor aumenta su

expresión, por lo que sugiere su papel en SNC (Jinka, 2010). Además de este receptor, existe otro de la familia de los receptores purinérgicos, el P2Y1, que en una dieta restringida aumenta su expresión, los autores sugieren que en este estado de dieta restringida, el receptor P2Y1 en hipotálamo, se expresa para mandar señales e iniciar el consumo de alimento.

Se sabe que en un estado de obesidad, la actividad del sistema serotoninérgico se ve disminuido; por eso se buscan alternativas que regresen a un estado activo de este sistema, una forma de regularlo es con el transportador de serotonina en neuronas presinápticas. Estudios recientes demuestran la relación que existe entre los receptores a adenosina A₃ y el transportador de serotonina.

La adenosina es un potente modulador de la transmisión sináptica. Además de la regulación de serotonina a nivel de transportador, se ha encontrado que los receptores a adenosina A₁ y A₂, tienen la capacidad de regular la liberación vesicular de serotonina (Okada, 1999). Okada en el 2002 encontró que los receptores A₁ y A₂ son capaces de producir cambios en la concentración extracelular de 5-HT en hipocampo. A₃ induce cambios en los niveles extracelulares de 5-HT por efectos en la recaptura y no en la liberación. Ya existen suficientes evidencias que sugieren que la activación del receptor a adenosina A₁ suprime la liberación del neurotransmisor serotonina, mientras que por otro lado la activación de los receptores A₂, promueven la liberación de este neurotransmisor. En el 2001 Okada publicó el mecanismo por el que se lleva a cabo la liberación de la serotonina vesicular, encontrando que A₁ promueve la inhibición del anclaje de la vesícula mediante P-VSCC/PKA/Sinaptobrevina, mientras que A_{2A} promueve que se lleve a cabo este mecanismo de anclaje y fusión de la vesícula, con la membrana de la neurona para su posterior liberación. Sin embargo la actividad de A₁ enmascara los efectos de los receptores A₂ y A₃ en cuanto a la liberación de serotonina, por eso es importante ver en un estado patológico de obesidad, como se encuentran distribuidos estos receptores.

Con base en lo antes mencionado y de acuerdo a los receptores a analizar en este trabajo, la propuesta fue el uso de un antagonista de dichos receptores, entre los

que se encuentran muchos sintéticos y selectivos así como derivados de manera natural como las metilxantinas.

2.7. Generalidades de las metilxantinas

Las metilxantinas son compuestas por un núcleo de purina, heterociclo que resulta de la formación de un anillo entre un núcleo pirimidínico y otro imidazólico. Estos compuestos provienen de manera general de plantas. Siendo este grupo formado principalmente de 3 metilxantinas, teofilina (té), teobromina (chocolate) y la cafeína (café). Sus estructuras varían de acuerdo al grado de metilación del núcleo denominado xantina, teniendo de esta forma, la cafeína 1,3,7- trimetilxantina, la teofilina 1,3- dimetilxantina y la teobromina 3,7-dimetilxantina.

Estos compuestos tienen la capacidad de actuar sobre los receptores de adenosina, gracias al parecido estructural que tienen a la adenosina (Figura 17).

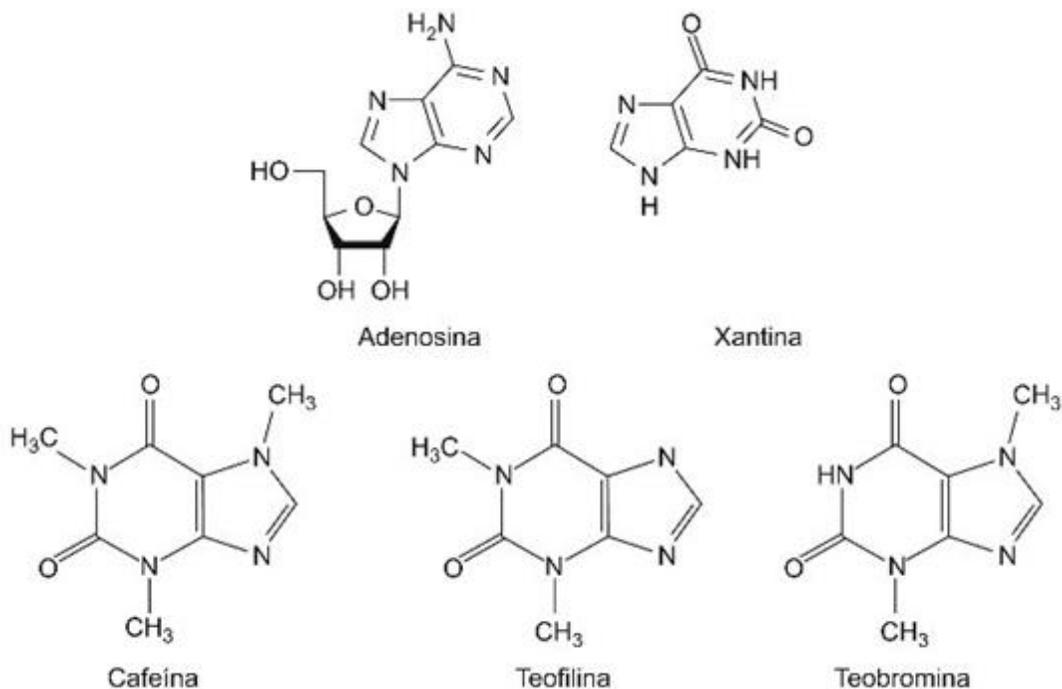


Figura 17. Estructuras de las metilxantinas y la adenosina

En el organismo estas moléculas presentan múltiples efectos en diferentes sistemas: respiratorio, en músculo esquelético, cardíaco y en el sistema nervioso central (Brailowsky y col., 2008). Todos estos efectos estimulantes se han asociado a la interacción con los receptores de adenosina.

La cafeína ha sido de interés debido al efecto que ha presentado sobre la modulación en la ganancia de peso, en modelos animales de obesidad inducida por dieta, sin embargo, su enfoque está principalmente en el efecto que tiene sobre tejido adiposo.

2.7.1. 1,3,7-Trimetilxantina y obesidad

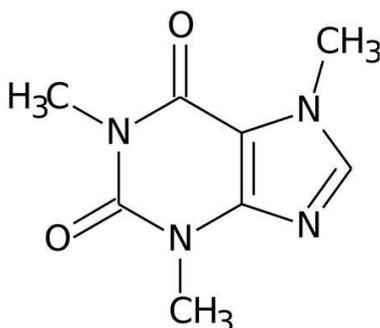


Figura 18. Estructura de la 1,3,7-trimetilxantina

La 1,3,7-trimetilxantina (Figura 18) es consumida extensamente en bebidas para obtener un efecto estimulante en sistema nervioso central, es usada terapéuticamente en combinación con ergotamina para dolores de cabeza derivados de una migraña y en combinación con un anti-inflamatorio no esteroideo en formulaciones analgésicas. Sola, es utilizada para el tratamiento de la depresión del sistema respiratorio en neonatos, hipotensión y obesidad (Sawynok, 2011).

Respecto a la obesidad, se ha demostrado que esta puede disminuir el peso en un modelo de ratas con obesidad. Panchal en el 2012, reportó que la administración

de cafeína en un modelo de obesidad, con una dieta alta en grasas, podía disminuir el peso y algunos parámetros bioquímicos como lípidos en sangre, proponiendo que este efecto está dado por su mecanismo de acción, que es el antagonismo de receptores a adenosina, en este caso en particular, en tejido adiposo. Ya se ha demostrado en estudios *in vitro* que los receptores a adenosina, como lo es el A₁, modulados por 1,3,7-trimetilxantina, tiene un efecto en la disminución de la adipogenesis y la regulación de leptina, y se considera a estos receptores como blancos para generar estrategias en enfermedades como la obesidad (Gharibi y col., 2012).

En el estudio que se hizo para verificar que la 1,3,7-trimetilxantina no tenía implicaciones en daño renal, tanto en un modelo de obesidad como en el tipo silvestre, se encontró que la administración de la metilxantina disminuía el consumo de alimento, pero solo en las ratas obesas y no en el tipo silvestre (Tofovic y col., 2002). Estos experimentos nos hacen pensar que existen cambios en los receptores de adenosina en un estado patológico de obesidad, en las estructuras encargadas de la regulación del apetito.

Por lo tanto, se considera que la 1,3,7-trimetilxantina tiene efectos lipolíticos y termogénicos demostrados en estudios *in vitro* e *in vivo* y ha sido examinado su potencial como uso en la reducción del peso corporal (Hursel, 2013). A nivel de sistema nervioso central (SNC), se refleja un sinergismo de esta metilxantina con efedrina, administración que en conjunto conlleva a una disminución de peso significativa, sin embargo, la parte molecular no ha sido abordada. Se cree que este efecto está dado por el efecto antagónico a de los receptores a adenosina en SNC (Sawynok, 2011).

Modulación en la expresión de los receptores a adenosina

Los receptores a adenosina tienen la capacidad de auto modularse de la siguiente manera: La activación constante de los receptores promueve el arresto de los mismos mediante arrestina, la formación de las vesículas que contendrán el receptor puede tener dos finales, el reciclaje para el anclaje del receptor

nuevamente a la membrana (7) o llevarlo a su degradación (8); además se ha demostrado que también bajo otros estímulos se puede modular las vesículas de reciclaje para llevarlos nuevamente a la membrana (Figura 19).

Lo receptores A1 en neuronas corticales, aumentan su expresión después de la exposición a adenosina a una concentración de 1 μ M en 2hr y regresan a su estado inicial de expresión a las 24hrs, sin embargo los receptores A2a tienen el efecto contrario, disminuyen su expresión al exponerse a la misma concentración de adenosina.

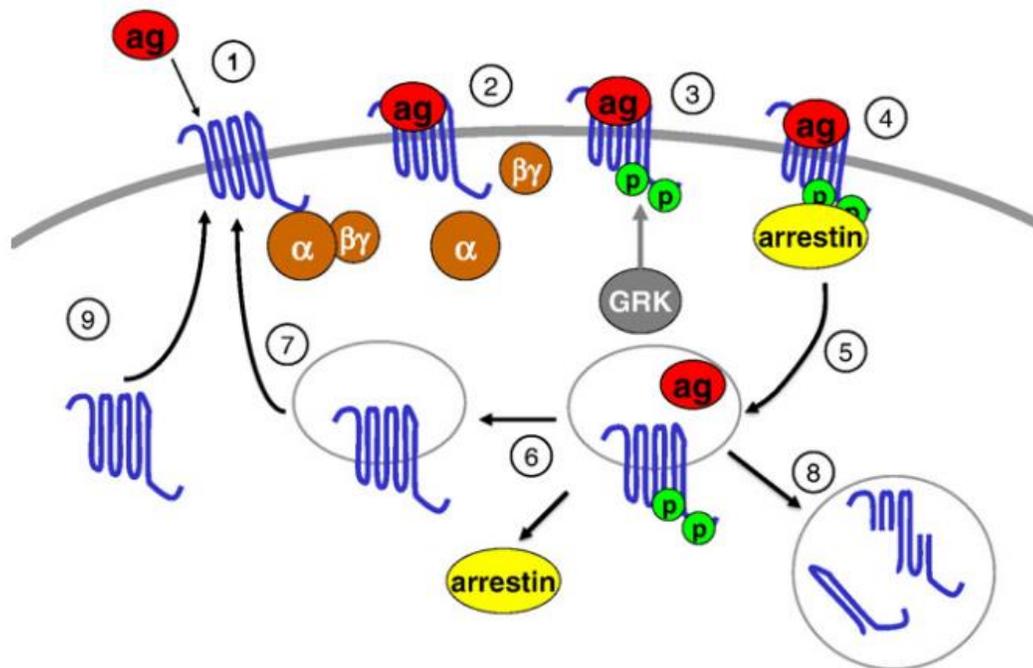


Figura 19. Teoría que muestra el tráfico de los receptores a adenosina

La cafeína, por otro lado, también ha demostrado tener la capacidad de modular la expresión de estos receptores. En estructuras como núcleo arcuato, la cafeína disminuyó la expresión del receptor A1 y aumentó la expresión del receptor A2a (Gaytan y Pasaro, 2012). Sin embargo, no se sabe cómo es que se llevan a cabo estos mecanismos. Una de las teorías es con base en la capacidad de la cafeína para modular epigenéticamente la expresión de algunos receptores, ya que se ha

demostrado que existe un aumento en la metilación de algunos genes, después de la exposición a esta molécula (Buscariollo y col., 2015).

De acuerdo a los antecedentes presentados, en este trabajo se pretende buscar la función de los receptores a adenosina en sistema nervioso central en la regulación del apetito, ya que podemos ver que receptores de esta familia, son capaces de responder a cambios en la dieta en estructuras como el hipotálamo. Existen moléculas que regulan la actividad de estos receptores y tienen un efecto considerable sobre sistema nervioso central, una de ellas es la 1,3,7-trimetilxantina.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen estudios de la modulación de los receptores a adenosina en periferia, sin embargo, el sistema nervioso central no ha sido explorado, por esta razón es importante evaluar cuál es el papel de los receptores a adenosina A₁ y A_{2A} en hipotálamo en un estado de obesidad, ya que existen evidencias que sugieren que pudieran estar participando en esta patología. Las metilxantinas son un importante grupo de antagonistas no específicos de los receptores a adenosina, su estudio en la obesidad ha tenido impacto de igual manera en sistema periférico, principalmente tejido adiposo, en estos estudios evalúan la cantidad de alimento consumida y han encontrado que existe una disminución en la ingesta de alimentos sin dar alguna explicación, en este trabajo se pretende encontrar respuestas que encaminen al mecanismo que pudieran tener los receptores a adenosina en hipotálamo, ya que esta estructura en SNC es la principal reguladora de la ingesta de alimentos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La obesidad inducida por una dieta alta en carbohidratos en ratas Sprague-Dawley genera cambios en la expresión génica y distribución de los receptores a adenosina A₁ y A_{2A} en hipotálamo?

5. HIPÓTESIS

La obesidad inducida por dieta alta en carbohidratos en ratas *Sprague-Dawley* genera cambios en la expresión génica distribución de los receptores a adenosina A₁ y A_{2A} en hipotálamo.

6. OBJETIVOS

6.6. OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la expresión y distribución de los receptores a adenosina A₁ y A_{2A} en hipotálamo de ratas con obesidad inducida por una dieta alta grasas y carbohidratos.

6.7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar un modelo de obesidad en ratas *Sprague-Dawley* inducido por dieta alta en grasas y carbohidratos.
- Comparar los cambios en el peso corporal de las ratas con obesidad inducida por dieta alta en grasas y carbohidratos derivados de la administración del antagonista de los receptores a adenosina 1,3,7-trimetilxantina.
- Comparar la distribución del receptor a adenosina A₁ y A_{2A} en hipotálamo de ratas control y obesas con y sin administración de cafeína mediante inmunohistoquímica.
- Cuantificar la expresión génica de los receptores a adenosina A₁ y A_{2A} mediante RT-PCR en hipotálamo de ratas control y obesas con y sin administración de cafeína

7. METODOLOGÍA

7.6. Reactivos

- Pentobarbital
- Buffer de Sales de Fosfato 10x (PBS)
- Paraformaldehído 4%
- Solución de sacarosa 3% en PBS 1x
- Medio congelador *Tissue Tek*
- Buffer de fosfatos con tritón X-100 (PBT)
- Solución leche en PBT al 3%
- Anticuerpo primario para receptor A₁ en cabra
- Anticuerpo primario para receptor A_{2A} en conejo
- Anticuerpo secundario pollo anti conejo
- Anticuerpo secundario burro anti cabra
- Glicerol
- *High Pure RNA Tissue Kit*
- Buffer de lisis
- Etanol absoluto
- *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit*
- *LightCycler®FastStart DNA Master SYBR Green I Kit*
- 1,3,7-Trimetilxantina

7.7. Materiales

- Estuche de disección
- Cajas petri
- Tubos eppendorf
- Vasos de precipitados
- Micropipetas
- Probetas
- Cámara húmeda
- Portaobjetos y cubreobjetos

- Cámara para revelado
- Mortero con pistilo

7.8. Equipos

- Estereoscopio
- Criostato
- Microscopio con cámara
- Refrigerador 4°C
- Congelador -20°C y -70°C
- Termociclador *LightCycler 1.5*
- Centrifuga

7.9. Diseño experimental

Cuadro 2. Descripción de cada uno los grupos que fueron utilizados a lo largo del experimento.

GRUPOS	DESCRIPCIÓN
1) CTRL	Ratas con dieta estándar
2) CTRL + Metilxantina	Ratas con dieta estándar + metilxantina
3) HED	Ratas obesas sin metilxantina
4) HED + Metilxantina	Ratas obesas + metilxantina

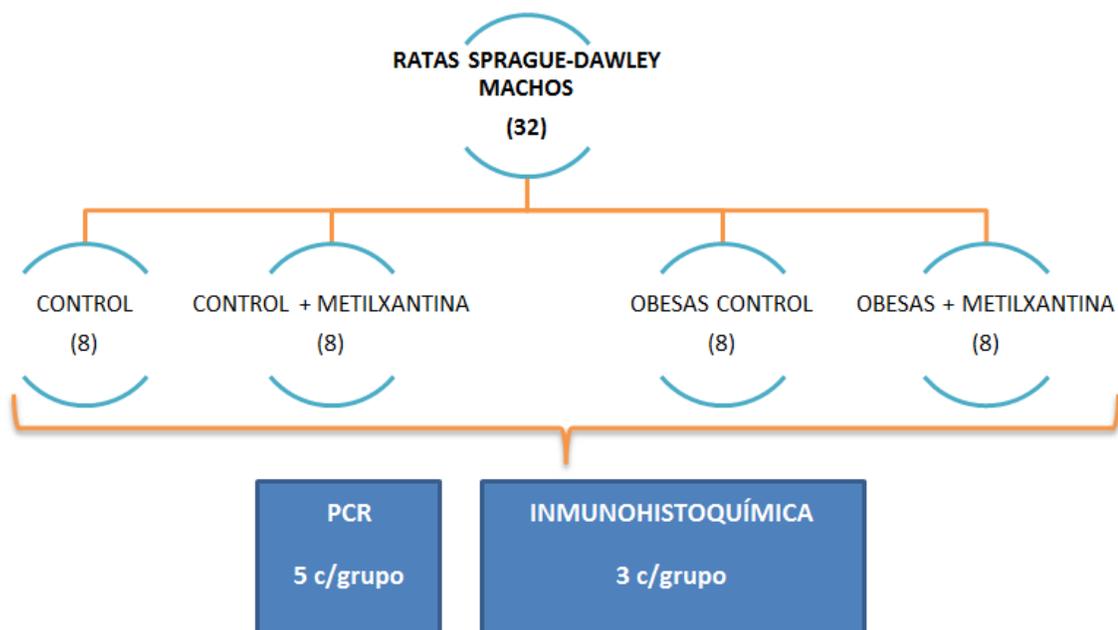


Figura 20. Diseño experimental de forma resumida que indica el número de ratas que fueron utilizadas para cada grupo y los experimentos que se realizaron.

6.5 Inducción de la obesidad

Ratas Sprague-Dawley de 3 meses de edad de aproximadamente 200-250g de peso, fueron adaptadas a las condiciones del bioterio de la Facultad durante una semana, con condiciones de temperatura entre 21 ± 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*. Posterior a este proceso de adaptación se generaron 4 grupos (mostrados en el cuadro 4) los cuales fueron expuestos a dieta y tratamiento por 4 meses. Los grupos fueron los siguientes: 1) Ratas con una dieta control, 2) ratas con obesidad inducida por dieta sin otro tratamiento, 3) ratas con dieta control y el antagonista y 4) ratas con obesidad inducida por dieta más antagonista.

La dieta HED se compuso por 50% de alimento base, 25% de manteca de cerdo, 25% leche condensada comercial. Dieta que corresponde a 433.53 kcal, comparada con la dieta control que presentará 342.9 kcal. El antagonista (1,3,7-trimetilxantina) fue administrado en una dosis de 0.1% en agua, el cual estuvo disponible *ad libitum* en los bebederos.

6.6 Parámetros bioquímicos

Se determinaron como parámetros bioquímicos glucosa y colesterol total mediante kits comerciales (*ContourTMTS Bayer* para glucosa y *Accurate[®]GCT Roche* para colesterol) en sangre, estos se determinaron al final del experimento.

Cada dos semanas se midió el peso de las ratas para monitorear el avance del modelo. Y se determinó además la cantidad de alimento y líquido consumido por jaula.

6.7 Inmunohistoquímica

6.7.1 Extracción del encéfalo

Se anestesiaron las ratas con pentobarbital sódico 40 mg/kg. Una vez anestesiadas se perfundieron, fueron decapitadas y se extrajo el encéfalo.

6.7.2 Preparación y fijación del tejido

Los tejidos extraídos se fijaron en cajas de papel aluminio con medio congelador de tejidos (Tissue tek) y se almacenaron a -70°C.

6.7.3 Cortes del tejido

Se realizaron cortes coronales de 12µm en el criostato y estos cortes se colocaron en laminillas y se conservaron a -20°C.

6.7.4 Inmunofluorescencia

Se seleccionaron las laminillas previamente preparadas con ayuda del estereoscopio (dos de cada grupo, una como control y otra como muestra). Se

colocaron en una cámara húmeda y se le realizaron 3 lavados con PBS 1X de 10 minutos cada lavado para cada una de las laminillas.

Después los tres lavados, se realizó un bloqueo con BSA al 3% en una concentración de 2 mg/mL en PBT y se incubaron durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron nuevamente 3 lavados con PBT 0.5% de 10 minutos entre cada lavado.

Posteriormente se adicionó el anticuerpo primario para el receptor de A₁ y A_{2A} en una concentración 1:200 a las muestras y solución de PBT 0.5% a los controles dejando incubar durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBT 0.5% y se agregó a todas las laminillas el anticuerpo secundario en una concentración de 1:3000 y se dejaron incubar por 2 horas. Pasado el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X, para finalmente colocar el cubreobjetos fijando con una gota de glicerol para su observación al microscopio confocal.

6.8 PCR en tiempo real

6.8.1 Extracción del ARN total

Se realizó la disección del hipotálamo, se congeló y se almacenó a -70°C. La extracción del ARN total se realizó con un kit comercial de Roche (MAGNA Pure Compact Roche®), primero se añadieron 400µl del buffer de lisis al tejido, se homogenizó con una jeringa de 5ml y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó por dos minutos a 13 000g a 4°C, una vez centrifugado se recuperó el sobrenadante y se llevaron 350µl a un tubo de muestra, se llevó el tubo a la gradilla del equipo y se procedió como se muestra en el ANEXO I, al final el tubo de barras es el que contenía el ARN y se llevó inmediatamente a -70°C.

6.8.2 Síntesis de cDNA

Del ARN recolectado en el tubo eppendorf de 1.5 ml se realizaron alícuotas para su cuantificación utilizando el espectrofotómetro Nano-Drop ND-1000. Con la concentración obtenida del ARN, se colocaron los micro litros necesarios para tener 1µg de ARN, el ADNc se sintetizó con un kit comercial de Roche (Transcriptor FirstStrandcDNASynthesis Kit) a partir del ARN.

Se colocaron en un tubo de 0.2 ml para PCR estéril los microlitros de ARN, posteriormente se añadió 1 µl de oligo-DT y se completó a un volumen final de 13 µl con agua grado PCR, se mezclaron y desnaturalizaron calentando a 65°C por 10 minutos. Por otro lado se hizo la mezcla reactivos para la síntesis de ADNc, colocando en un tubo estéril de 0.2 ml: 4 µl de buffer de incubación RT, 0.5 µl de inhibidor de ARNasas, 2 µl mezcla de nucleótidos y 0.5 µl de enzima RT (retrotranscriptasa) por cada reacción.

Una vez finalizados los 10 minutos se añadieron 7 µl de la mezcla de síntesis de ADNc, mezclando bien para posteriormente poner a incubar la enzima a 55°C por 30 minutos, después se inactivó la enzima calentando por 5 minutos a 85°C, finalmente se guardó el ADNc recién sintetizado a -20°C.

6.8.3 PCR en tiempo real

Para montar la PCR en tiempo real se utilizó el kit comercial de Roche llamado: LightCycler®FastStart DNA Master SYBR Green I, con el cual se preparó una mezcla de reacción, la cual contenía por cada reacción: 4 µl de agua grado PCR, 1.5 µl de cloruro de magnesio 25 Mm, 0.5 µl de primer *foward*, 0.5 µl de primer *reverse* y 1 µl del vial que contiene la enzima y el Syber Green; los primers (Invitrogen) de cada gen: los genes de interés (ADORA1 y ADORA2A) y el constitutivo (β-actina) se muestran en la tabla 3, los cuales fueron diseñados en el programa primer 3.

Se montaron los capilares que posteriormente fueron cargados con 7 μ l de la mezcla de reacción y a continuación se adicionaron 2 μ l de muestra a cada capilar, en seguida se centrifugaron los capilares por 1 minuto a 2000g. Se colocaron los capilares en el carrusel para poder cargarlos al termociclador Light Cycler 1.5. Se procedió a poner las condiciones del programa de qPCR para el cual se utilizó el software LightCycler® 4.1, finalmente se realizaron las corridas del experimento.

Cuadro 3. Primers que fueron usados para la PCR

PROTEÍNA	PRIMER
Receptor de adenosina A ₁	Forward Primer: 5'-TTGCCTACTGCTTATCTT-3', Reverse Primer: 5'-TCTTGTATCTGACGGTAA-3'
Recetor de adenosina A _{2A}	Left primer 5'-TGATGCCAGAGCAGATCAAC-3' Right primer 5'-GAGGCAGCAAGAAGGAACAC-3'
β -actina	Left primer 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' Right primer 5'-TCTCAGCTGTGGTGGTGAAG-3'

6.8.4 Cuantificación relativa

Se realizó una curva de calibración para cada muestra, para obtener la eficiencia de la curva. Para dicha curva se prepararon una serie de diluciones: 1:2, 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:10000, para calcular la pendiente y de esta manera obtener la eficiencia, $E=10^{-\text{Pendiente}}$, se graficó el logaritmo de la concentración de ADN contra CT para poder obtener la ecuación de la recta y así tener la pendiente. Una vez que la curva de calibración se obtuvo con una eficiencia de 1.8 a 2, se procedió al análisis de las muestras por triplicado, así mismo se utilizó actina como gen constitutivo y los controles (mezcla de reacción sin cDNA). Para sacar la cuantificación se siguió el método $\Delta\Delta\text{CT}$.

6.9. Análisis estadístico

Para determinar la diferencia significativa entre los grupos a analizar se realizó un ANOVA de dos vías seguido de un análisis *post hoc* de *Tukey*.

6. RESULTADOS

Inducción de obesidad

Se logró inducir obesidad en ratas macho Sprague Dawley mediante una dieta alta en grasas y carbohidratos (HED) (figura 21), se observaron cambios significativos en la ganancia de peso respecto al control sin tratamiento desde la semana 5, en aquellos grupos que estaban recibiendo la dieta HED. Los grupos que recibieron una dieta estándar y tratamiento no presentaron cambios significativos en la ganancia de peso, sin embargo se ve una tendencia a ganar menos peso que el control. A partir de la semana 9 en el grupo HED se ve un disparo en la ganancia de peso, comportamiento que no se observa en aquellas que estaban recibiendo la dieta HED suplementada con cafeína. Los grupos HED W/C no presentaron diferencia significativa respecto al control sin tratamiento al final del experimento.

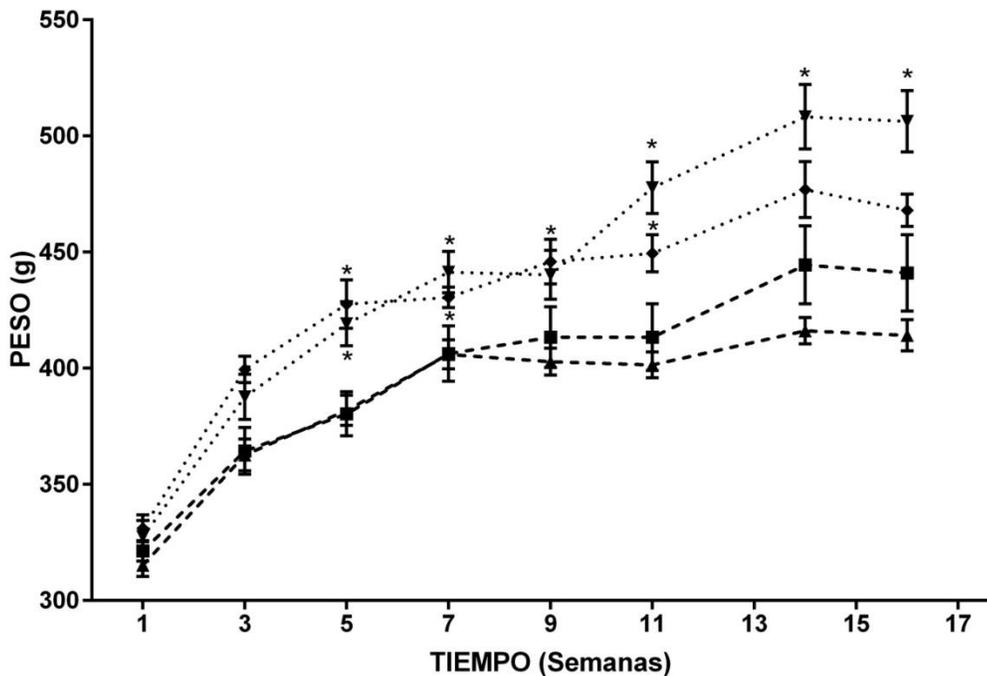


Figura 21. Ganancia de peso respecto al tiempo. El peso corporal fue determinado cada dos semanas para cada grupo (n=8). Los valores están expresados como la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencia significativa

respecto al CTRL S/T $p \leq 0.05$. Se realizó un ANOVA seguido de un análisis *post hoc* Dunet.

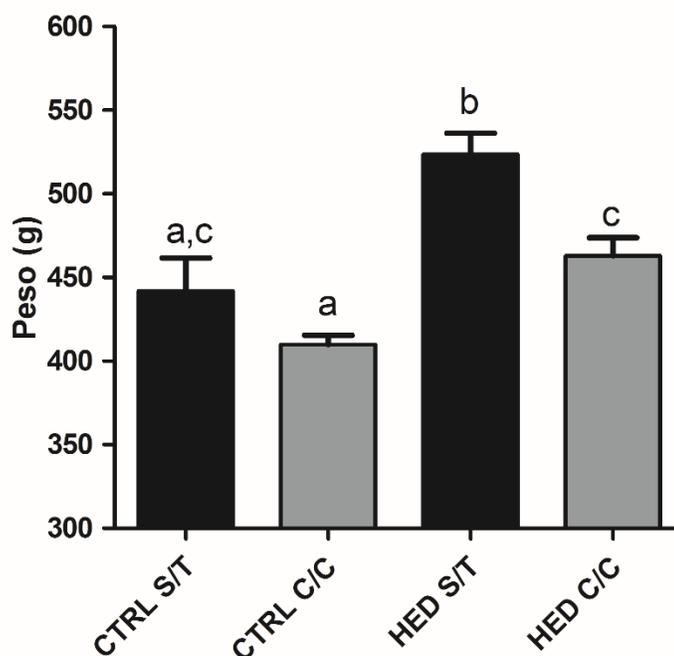


Figura 22. Ganancia final de peso. Se muestran los pesos al final del experimento de cada grupo (n=8). Los valores están expresados como la media \pm SEM. Se realizó un análisis de ANOVA seguido de una prueba post-hoc de Tukey, la letra distinta indica diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

En la figura 22 podemos observar el peso final que tuvieron las ratas en cada uno de los grupos. La ganancia de peso después de la administración de la dieta HED S/T comparada con la dieta control CTRL S/T fue mayor con un 16.4% siendo estadísticamente significativa. Para aquellas que recibieron una dieta estándar (CTRL) no hubo diferencia significativa en la ganancia de peso entre los grupos después del tratamiento, sin embargo se ve un tendencia a disminuir su peso final. Las ratas que estuvieron recibiendo la dieta HED con cafeína, disminuyeron la

ganancia en peso, quedándose en el peso de las que recibieron una dieta estándar, es decir no desarrollaron obesidad inducida por la dieta.

Consumo de alimento

Así mismo, se determinó el consumo de alimento de cada grupo diariamente, y en la figura 23 se muestra el promedio del consumo por semana. Los grupos que fueron alimentados con la dieta HED en las primeras semanas consumieron una cantidad menor de alimento, que aquellas con la dieta estándar CTRL. En la figura 23 se observa que después de la semana 9 existe un incremento en el consumo de alimento, que puede relacionarse con el incremento en la ganancia de peso, esto para los grupos HED S/T, sin embargo, la cantidad de comida que consumieron aquellas que se les administró cafeína, se mantuvo durante todo el experimento.

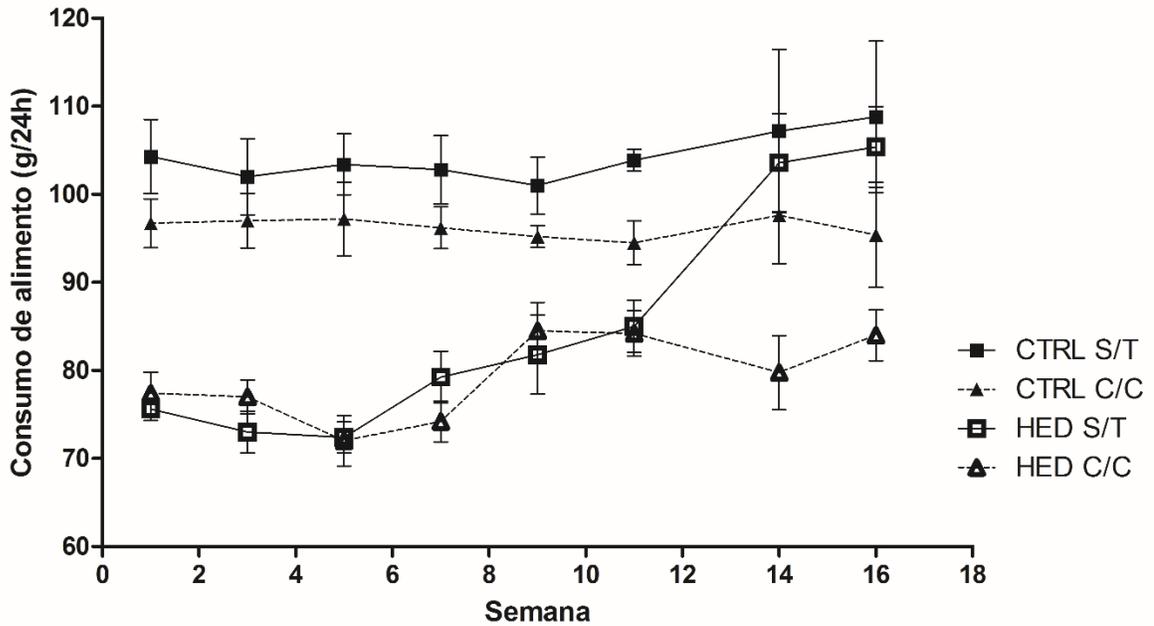


Figura 23. Consumo de alimento respecto al tiempo. En la gráfica se muestra el consumo de alimento promedio de cada semana. Los valores están expresados como la media \pm SEM de cada grupo (n=5).

Al finalizar las dietas y tratamientos no se observó diferencia significativa entre los grupos CTRL S/T, CTRL C/C y HED S/T en cuanto al consumo de alimento.

Podemos observar en la figura 24, que en aquellas ratas que fueron alimentadas con una dieta HED y cafeína consumieron una cantidad menor de alimento, comparadas con el grupo HED S/T. En las ratas que se alimentaron con una dieta estándar, la cafeína generó cambios significativos en el consumo de alimento, sin embargo, sí se observa una tendencia a disminuir la cantidad de alimento consumida.

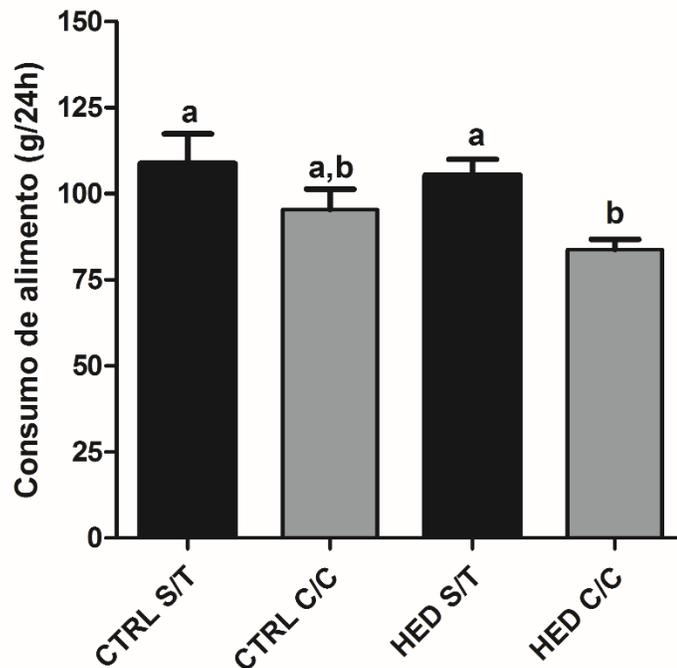


Figura 24. Consumo de alimento en la semana final del experimento. En la gráfica se muestra el consumo de alimento promedio en la última semana de tratamiento. Los valores están expresados como la media \pm SEM de cada grupo (n=5). Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías seguido de un post hoc de Tukey, la letra diferente expresa diferencia con una significancia de $P \leq 0.05$

Consumo de líquido

De igual manera, se monitoreó la cantidad de agua consumida diariamente, expresado en la gráfica como el promedio semanal por rata (Figura 25). Los grupos que fueron alimentados con una dieta HED consumieron una cantidad menor de líquido, comparados con los que se alimentaron con una dieta estándar (CTRL), comportamiento que se mantuvo durante las 16 semanas analizadas.

No existió diferencia significativa en el consumo de líquido entre los grupos CTRL S/T y CTRL C/C, ni tampoco entre los grupos HED S/T Y HED C/C; lo que indica que el consumo de cafeína no modifica la cantidad del consumo de líquido.

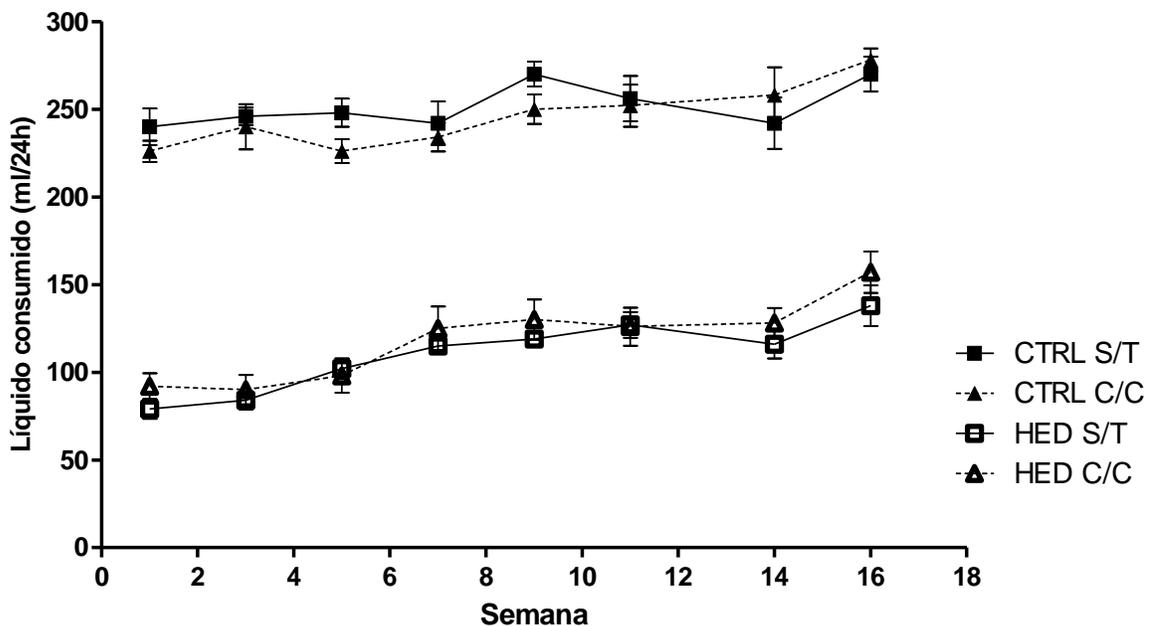


Figura 25. Consumo de líquido respecto al tiempo. En la gráfica se muestra el consumo de líquido promedio de cada grupo por semana. Los valores están expresados como la media \pm SEM de cada grupo (n=5).

Parámetros bioquímicos

En la semana 16 se realizó la determinación de glucosa y colesterol plasmáticos (Figura 26). Tanto para glucosa y colesterol no existió diferencia significativa contra el control sano (CTRL S/T). Con estos resultados se muestra que ni la dieta administrada, ni la cafeína varían significativamente los niveles de glucosa y colesterol, bajo las condiciones planteadas para este experimento.

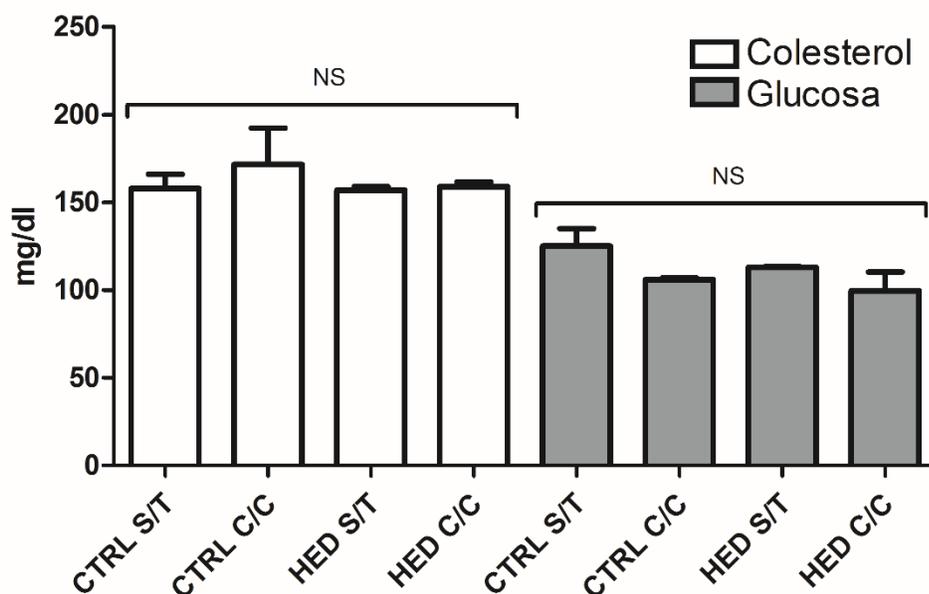


Figura 26. Determinación de colesterol y glucosa total en la semana final del experimento. En la gráfica se muestra la concentración de colesterol y glucosa por grupo expresada en mg/dl en la última semana de los tratamientos y dietas. Los valores están expresados como la media \pm SEM de cada grupo (n=3). Se realizó un ANOVA seguido de Dunnet comparando contra los CTRL S/T de cada parámetro.

Cuantificación relativa de los niveles de mRNA de A1 y A2a en hipotálamo total de rata

Para verificar los cambios inducidos en los genes de los receptores A1 y A2a (ADORA1 y ADORA2a respectivamente) por efecto de la dieta o del tratamiento en el hipotálamo total de rata, se utilizó RT-PCR en tiempo real. Los datos fueron normalizados utilizando actina como gen constitutivo para la cuantificación relativa.

En la figura 27 se muestra la representación gráfica de los niveles relativos de mRNA para el gen A1 y A2a en los diferentes grupos. El análisis estadístico muestra que los niveles de mRNA de A1 en ratas adultas sanas (CTRL S/T) presentan niveles más bajos que los del receptor A2a siendo estadísticamente diferentes, observándose la misma tendencia para los grupos CTRL C/C y HED C/C, sin embargo, comparando los niveles relativos de mRNA de A1 y A2a en el grupo HED S/T no existe diferencia significativa.

Por otra parte, en cuanto a la dieta HED, el aumento de grasas y carbohidratos en el alimento de las ratas promovió un aumento en la expresión génica de A1 y A2a en el hipotálamo, en estos grupos la cafeína indujo una disminución en la expresión de A1 en HED C/C comparados con HED S/T; sin embargo, el grupo de ratas que recibió HED suplementada con cafeína no generó cambios en la expresión de A2a, de igual manera comparando con HED S/T.

Además en las ratas que consumieron una dieta estándar, la cafeína indujo una disminución en la expresión tanto de A1 como A2a, siendo de igual manera el receptor A2a el que presenta mayores niveles de expresión.

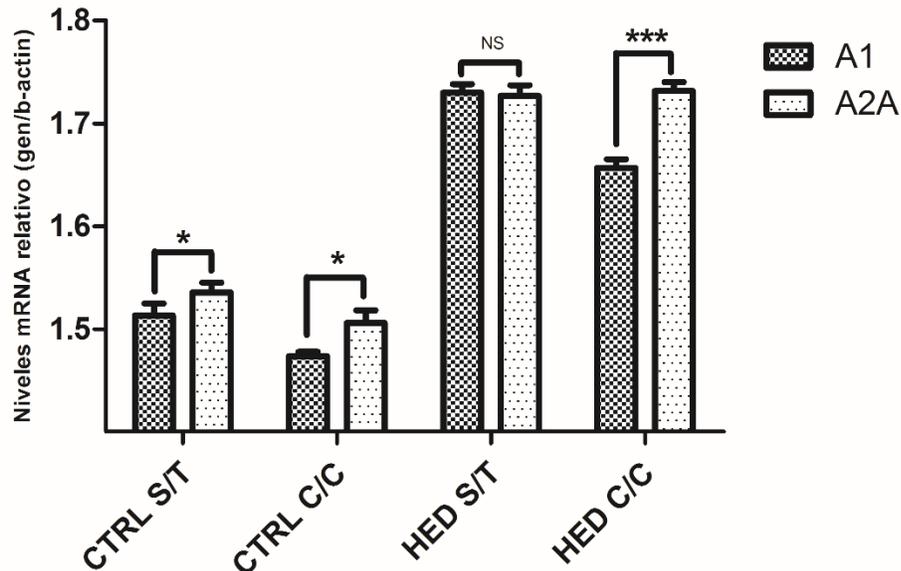


Figura 27. Cuantificación relativa del mRNA de los receptores A1 y A2a en hipotálamo total de rata. Se muestran los datos normalizados con base en el gen actina, siendo los valores expresados como la media \pm DE. Los asteriscos representan diferencia significativa, T de *student*. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ mientras que NS, No existe diferencia significativa,

Determinación de los niveles de expresión de los receptores a A1 y A2a en hipotálamo de rata por inmunohistoquímica

Se determinó la distribución de los receptores a adenosina A1 y A2a en hipotálamo de rata en núcleo paraventricular (PVN), mediante métodos de inmunohistoquímica de fluorescencia en cortes coronales del encéfalo. En este corte podemos observar el 3er ventrículo (3V) de donde anatómicamente podemos ubicar el núcleo paraventricular. El análisis de los receptores se realizó de forma independiente, teniendo condiciones específicas para cada uno de los receptores.

En las figuras 28 y 29 se muestran las imágenes confocales del análisis inmunohistoquímico para el receptor A1 y A2a; en estas imágenes se incluye un

blanco (BCO), el cual recibió el mismo tratamiento que las demás laminillas exceptuando la adición del anticuerpo secundario, en estas fotos podemos ver que no existe marca inmunorreactiva (marca en forma de media luna), solo se ve un ligero fondo. Esta laminilla se incluye para asegurar que no existen marcas inespecíficas dadas tanto por el anticuerpo secundario como el tejido.

Después para los grupos a analizar, la adición del anticuerpo primario generó marca inmunorreactiva al observarlos al microscopio, que se ve como una mayor fluorescencia en forma de media luna. Los resultados están observados a 10x (Izquierdo) y 40x (derecho).

Para la cuantificación se realizó el análisis de los grupos por triplicado, se fijaron las condiciones en el microscopio para la toma de las fotografías y con esas condiciones se tomaron todas las fotos de cada receptor; se hizo el análisis en el *software* ZEN lite de Zeiss, en donde se toma una media de la intensidad de la fluorescencia que emiten las laminillas (marca inmunorreactiva) bajo una área determinada.

Para el receptor A1 (Figura 28) podemos observar marca inmunorreactiva en el núcleo paraventricular (el área del hipotálamo analizada). La marca inmunorreactiva de A1 se ve mejor definida en los grupos que recibieron una dieta HED (HED S/T y HED C/C), comparados con los que recibieron una dieta control (CTRL S/T y CTRL C/C). Al ver las laminillas en 10x se observan, además de las marcas circulares, marcas alargadas. La semicuantificación con el *software* muestra el aumento en la expresión del receptor después de una exposición a una dieta alta en grasas y carbohidratos (Figura 27a) comparadas con el control sano (CTRL S/T), lo cual es consistente con lo observado en las microfotografías. Por otro lado la cafeína, que fue el tratamiento administrado, no ejerce cambios entre grupos, podemos observar que no existe diferencia significativa entre CTRL S/T y CTRL C/C, lo mismo para los grupos que recibieron una dieta HED con y sin cafeína, sin embargo, se ve una tendencia a aumentar la expresión.

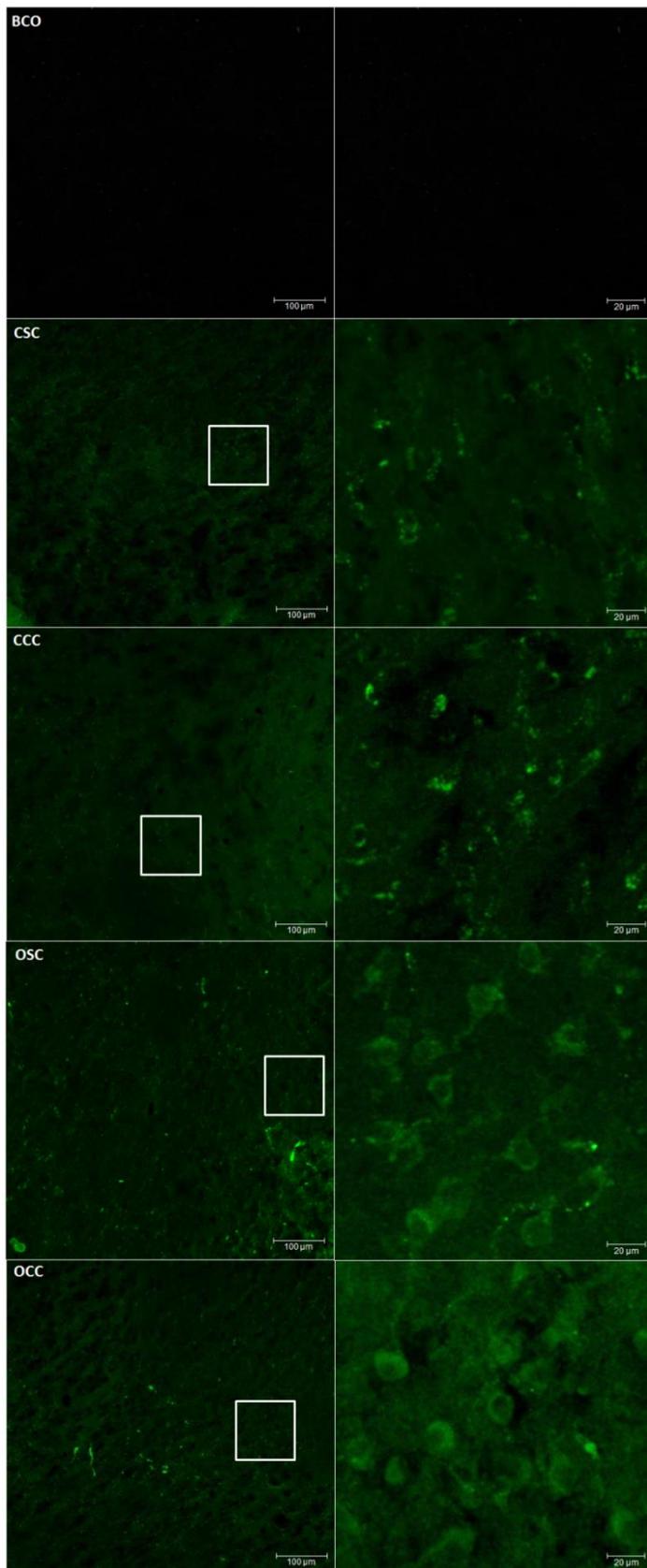


Figura 28. Imágenes confocales de la expresión del receptor A1 en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Se muestran las imágenes 10x y 40x (izquierda y derecha respectivamente)

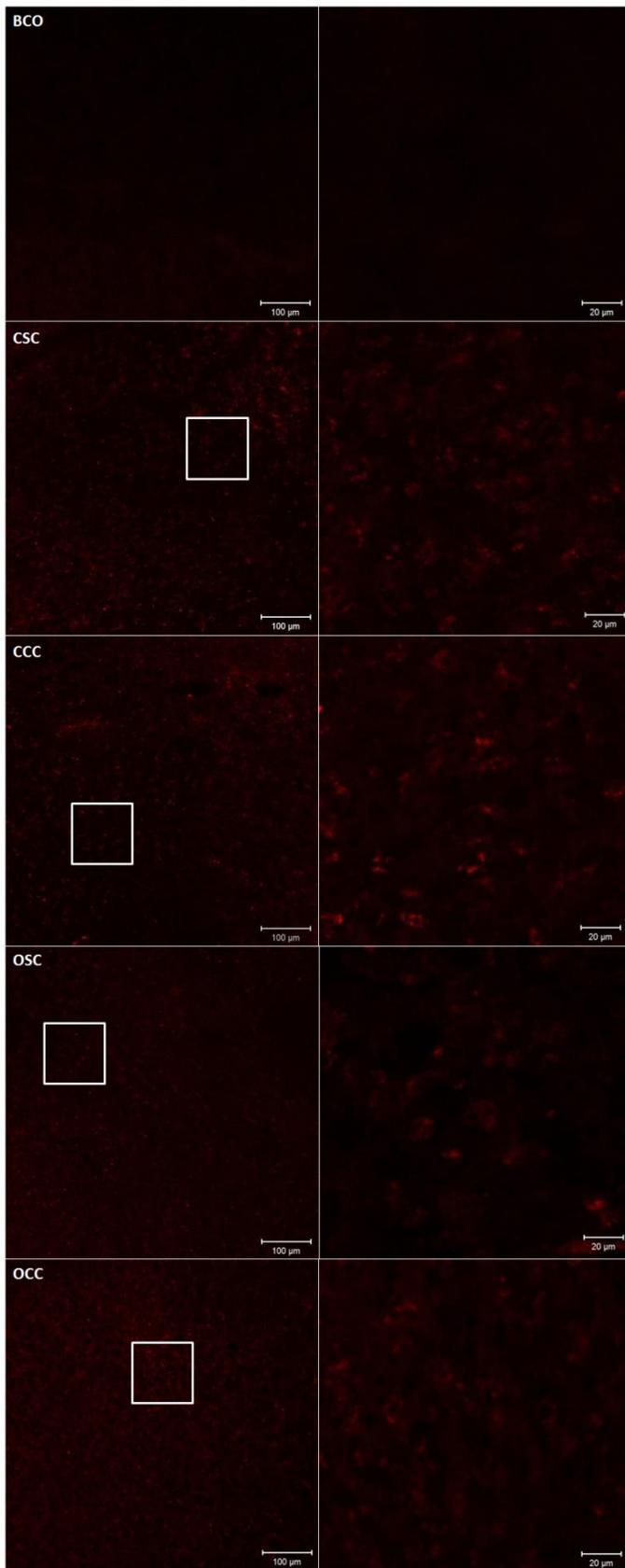


Figura 29. Imágenes confocales de la expresión del receptor A2a en núcleo paraventricular del hipotálamo. Se muestran las imágenes 10x y 40x (izquierda y derecha respectivamente)

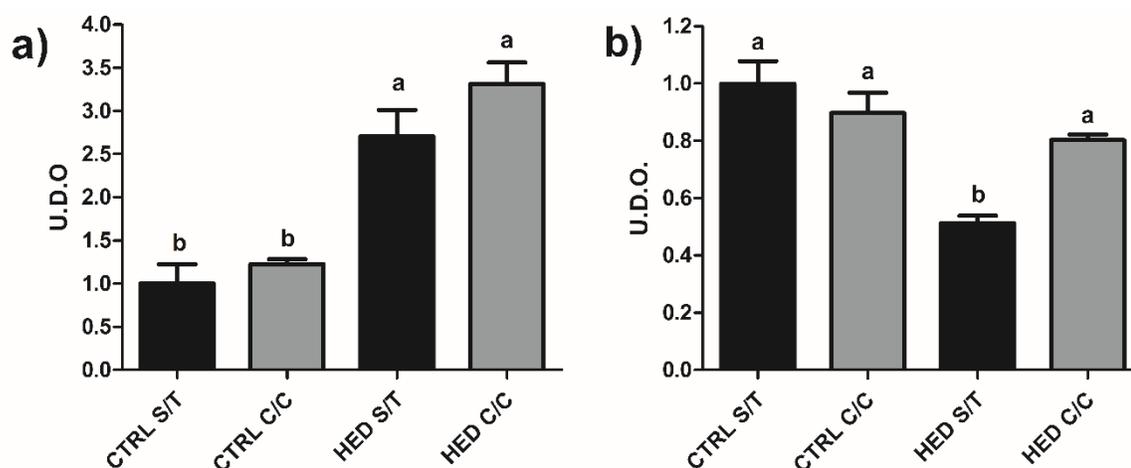


Figura 30. Densitometría de la expresión del receptor a) A1 y b) A2a en PVN en hipotálamo de rata. Los valores están expresados como la media \pm DE. Se realizó un análisis estadístico de ANOVA de dos vías seguido de un post hoc de Tukey, la letra diferente expresa diferencia con una significancia de $P \leq 0.05$

El receptor A2a (Figura 29) también se encuentra expresado en PVN en el hipotálamo de rata. En las microfotografías de los grupos CTRL se ve un mayor número de células marcadas para A2a que en las observadas para el receptor A1. En la semicuantificación, contrario al receptor A1, el receptor A2a disminuye su expresión en PVN después de que las ratas fueron expuestas a una dieta HED comparadas con el control sano (CTRL S/T).

La cafeína no modifica la expresión del receptor A2a en aquellos grupos que recibieron una dieta control, sin embargo, en los grupos HED se observó algo interesante; como se comentó, la dieta HED promueve una disminución de la expresión del receptor A2a, pero en el grupo que recibió la dieta HED y cafeína los niveles son estadísticamente iguales a los del control sano (CTRL S/T), es decir, no mostró una disminución la expresión del receptor.

Localización del receptor A2a en PVN del hipotálamo de rata, doble marcaje con GFAP.

Además se realizó un marcaje inmunohistoquímico doble para el receptor A2a (rojo) y la Proteína Acida Fibrilar Glial (GFAP por sus siglas en inglés) (azul), para observar en qué tipo celular se están expresando los receptores en este núcleo. Podemos ver en la figura 31 que el GFAP se encuentra expresado principalmente en los bordes del tercer ventrículo (3V) con ligeras proyecciones al interior del hipotálamo, sin embargo, al realizar el *merge*, estas proyecciones no colocalizan con el receptor A2a y las formas (estrelladas) del marcaje de GFAP son diferentes a las que observamos en las microfotografías de ambos receptores.

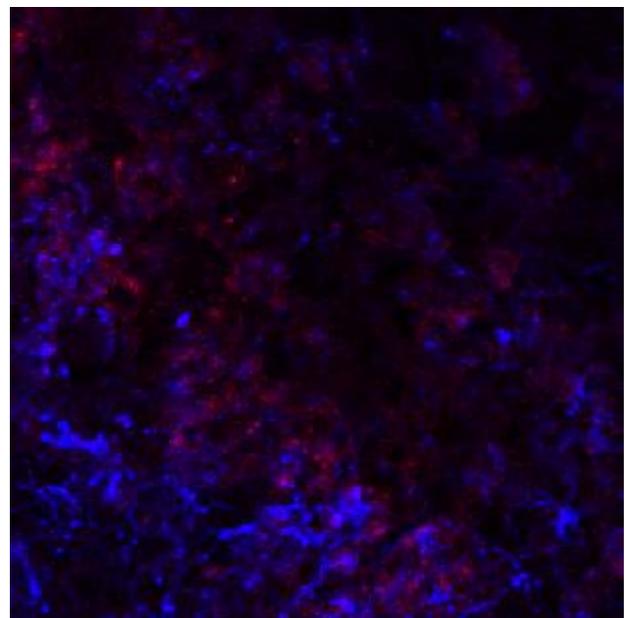
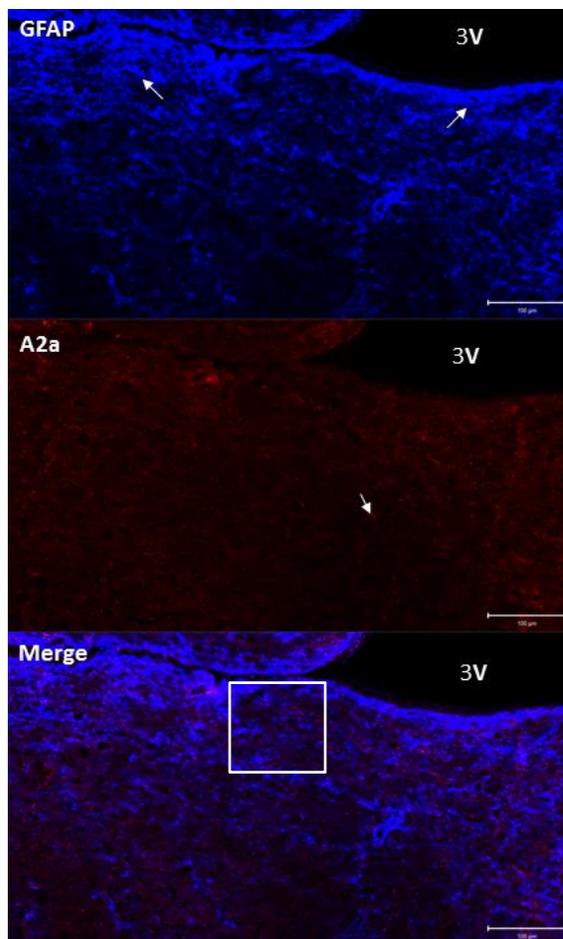


Figura 31. Marcaje doble de células gliales GFAP (Azul) y el receptor A2a (rojo) en el núcleo PVN del hipotálamo de rata. Se muestra también una ampliación del *merge* para apreciar mejor la colocalización.

7. DISCUSIÓN

La obesidad en la actualidad es un problema de índole mundial, enfermedad para la cual se buscan alternativas para su abordaje y prevención. En este estudio se demostró que la cafeína tiene la capacidad de inhibir la ganancia en peso de ratas que fueron expuestas a una dieta HED, resultados que concuerdan con los reportados anteriormente (Tofovic y col., 2002) (Rustenbeck y col., 2014), sin embargo, el enfoque que se tenía en este tipo de estudios estaba dirigido a tejido en periferia como lo es tejido adiposo. En este estudio se abordó el hipotálamo en sistema nervioso central, y se encontró que la dieta HED modifica la expresión de los receptores A1 y A2a, receptores sobre los que actúa la cafeína, algo interesante fue que la cafeína solo modifica la cantidad de alimento consumido de la dieta HED y no en la dieta estándar y que además la cafeína entre grupos de tratamiento solo modificó la expresión proteica de A2a en los que recibieron la dieta HED con y sin cafeína.

Las ratas *Sprague Dawley* utilizadas para el modelo de obesidad en este estudio, presentaron un incremento del 16.4% del peso corporal al estar expuestas a una dieta HED, comparadas con las que se expusieron a la dieta control. Ricci y colaboradores en el 2012, mencionan que para que podamos considerar como modelo de obesidad a un grupo de ratas después de haberse sometido a una dieta especial, deberán presentar una ganancia mínima en peso respecto al control del 13-15%, siendo el modelo utilizado para este estudio válido de acuerdo a lo mencionado por el autor.

Se sabe que las ratas, en especial las ratas *Sprague Dawley*, al estar expuestas a una dieta alta en grasas y carbohidratos, comenzarán a acumular tejido adiposo y ganar más peso; se ha reportado que después de la semana 4 o 5 comienza a diferir el peso de las ratas CTRL comparadas con las que están siendo expuestas a la dieta HED (Lutz y Woods, 2012), resultados que concuerdan con los presentados en este estudio, ya que vemos un aumento significativo después de la semana 5 en el grupo HED comparadas contra el CTRL. Estos resultados

mencionados anteriormente, presentan discrepancias con lo reportado por Panchal y colaboradores en el 2012, donde bajo una dieta HED similar a la administrada en este estudio, este grupo de investigadores encuentran un aumento significativo antes de la semana 4, sin embargo, el peso final en la semana 16 podemos observar una media en peso muy similar a las que tenían las ratas de este estudio; la diferencia puede radicar en el contenido calórico de la manteca utilizada por cada uno de los grupos de investigación.

La cafeína no generó en el peso final cambios significativos en los grupos que recibieron una dieta estándar, sin embargo, es interesante resaltar los resultados encontrados para las ratas que recibieron una dieta HED y cafeína, ya que la cafeína impidió la ganancia en peso dada por la dieta HED, ya que no se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo con dieta control; estos resultados son consistentes con los de un estudio en el cual se administró una dieta HED para generar un modelo de Alzheimer, donde la cafeína mostró el mismo comportamiento, inhibiendo el aumento de peso corporal, solo en aquellas que consumieron una dieta HED y no una dieta estándar (Moy y McNay, 2013). Sin embargo, los autores explican estos resultados refiriéndose a que posiblemente la cafeína actúa en el tejido adiposo generando lipólisis, ya que ellos observan cambios en la cantidad de colesterol y NEFA en suero sanguíneo después del tratamiento, que les sugiere que se están llevando a cabo modificaciones en el metabolismo.

En nuestro estudio, a diferencia de lo mostrado por Moy y McNay, los resultados en la cantidad de colesterol y glucosa no se vieron afectados ni por la dieta HED ni por la cafeína, la principal diferencia es que la dieta de estos autores solo estaba formada por grasas, mientras que nosotros agregamos además de la grasa carbohidratos, siendo menor la cantidad de grasa contenida en nuestra dieta que la de Moy y McNay. Esto podría ser consistente con estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en donde la mezcla de carbohidratos (leche condensada) y grasa (aceite de maíz), no genera cambios en la concentración de glucosa ni colesterol final en ratas jóvenes que fueron expuestas a 15 semanas de tratamiento

(Lopez-Esparza y col., 2014). Es importante resaltar el hecho de utilizar ratas jóvenes, ya que en un modelo de Alzheimer realizado en el laboratorio, se utilizaron ratas adultas (6 meses) que fueron expuestas a una dieta alta en colesterol y los cambios en la concentración de este parámetro aumentaron significativamente, comparadas con los grupos que recibieron una dieta control (Mendiola-Precoma y col., 2016). Por lo que podemos esperar que las ratas jóvenes tengan mayor capacidad metabólica para restablecer los valores de algunos parámetros bioquímicos sanguíneos como lo es la glucosa y el colesterol; esto podría ser apoyado por los resultados mostrados por Rustenbeck y col. 2014, en donde ratones jóvenes fueron expuestos a una dieta alta en grasas y en la semana 10 mostraron un aumento en los niveles de glucosa, sin embargo, al seguir expuestos a la dieta, en la semana 26 los valores de glucosa se habían restablecido.

Con los resultados de los parámetros bioquímicos no podemos sugerir en este estudio que la cafeína promueve un aumento en la lipólisis, ya que la dieta *per se* no modificó estos parámetros comparando contra el control sano. Pero en este punto podemos resaltar el comportamiento en el consumo de alimento, que si bien, este comportamiento nos permite explicar las modificaciones en la ganancia en peso de los grupos analizados.

La cafeína promovió una disminución en la cantidad de alimento consumido en los grupos que estuvieron consumiendo una dieta HED, pero no en los expuestos a una dieta control. Estos resultados son realmente interesantes ya que pareciera que la cafeína puede regular el apetito de un tipo específico de alimento, en este caso las grasas, que en algunos artículos lo determinan como "*palatable food*". En las primeras semanas, las ratas consumen menor cantidad de alimento bajo una dieta hipercalórica (HED) comparadas con una dieta estándar, y esto se debe a que las ratas son denominadas isocalóricas, es decir, tienen la capacidad de consumir solo las calorías necesarias (Houssein y col., 2104), sin embargo en este estudio, después de la semana la semana 8, existe un disparo en la cantidad del consumo de alimento de la dieta HED, aumento que concuerda con el disparo en la ganancia de peso del grupo HED S/T; se ha determinado que en un modelo animal, la

exposición a una dieta alta en grasas y carbohidratos promueve un aumento del 25% de la expresión del NPY en núcleos específicos en hipotálamo, uno de ellos es el núcleo paraventricular, que en este núcleo, el aumento de este péptido se traduce en la “necesidad” de seguir consumiendo alimento, por lo tanto generar sobrepeso y después obesidad, ya que se rompe con el sistema isocalórico que tienen las ratas (Archer y col., 2005).

Algo interesante observado fue que la administración de cafeína inhibió el aumento en el consumo de alimento de la dieta HED que se observa después de la semana 8; la cafeína como ya se mencionó anteriormente es un antagonista de una familia de receptores acoplados a proteínas G, en estudios anteriores se ha demostrado que la activación o inactivación de receptores acoplados a proteínas G en algunos de los núcleos del hipotálamo modula procesos de apetito, siendo el efecto dado por la modulación de la expresión de algunos neuropéptidos; por ejemplo, la activación de receptores tipo cannabinoide CB1 por inyecciones de THC (agonista de los receptores) intracerebroventriculares en PVN, promueve que se inicie el consumo de alimentos, mientras que el antagonista inhibe este proceso (Verty A y col. 2005), los autores no elucidan el mecanismo pero se cree que es por la modulación de la expresión del NPY; además se demostró que agonistas de receptores acoplados a proteínas Gs en neuronas que expresan proteína similar agouti (AgRP) promueven de igual manera un aumento en el consumo de alimento, los autores encuentran que la activación de estos receptores promueve un aumento en la expresión de este péptido, que en sistema nervioso central actúa como orexigénico (Nakajima K y col., 2016). Bajo estas referencias podríamos esperar que la administración de cafeína podría estar teniendo algún efecto en hipotálamo para que se inhiba el consumo excesivo de grasas.

Para comenzar a probar esto, se evaluó qué efectos ejercen la dieta y el consumo de cafeína en la expresión génica y proteica de los receptores A1 y A2a en hipotálamo de rata, con el fin de observar si estos podrían estar relacionados en el proceso patológico de la obesidad.

El gen del receptor A1 se encuentra en menor medida expresado que el receptor A2a en el hipotálamo de rata en un estado no patológico en edad adulta, estos resultados concuerdan con lo reportado por Gaytan y Pasaro en donde se cuantificó por PCR en tiempo real la cantidad de mRNA de estos genes en ratas Sprague Dawley, presentando una cuantificación relativa de 2003 unidades para A2a y 111 para el gen del receptor A1, hasta aquí es interesante mencionar que esta expresión depende del estado de desarrollo del cerebro, ya que en la semana 5 de desarrollo la expresión génica del receptor A1 es mayor que la del A2a en el hipotálamo total de la rata (Gaytan y Pasaro, 2012) (Dixon y col., 1996).

Los resultados de la PCR en tiempo real arrojaron que la dieta HED promueve un aumento en la expresión tanto del gen del receptor A1 y A2a; estudios similares a estos se han realizado, pero en ellos, diferente a administrar una dieta alta en calorías, promueven una dieta restringida, es decir, restringen el alimento por determinado tiempo; bajo esta condición el receptor A1 aumentó su expresión, con lo cual los autores sugieren que se trata de una respuesta fisiológica para que se inicié la alimentación (Jinka y col., 2010), sin embargo, bajo los resultados obtenidos en esta tesis, el aumento en la expresión del gen del receptor A1 no podría sugerir que fuese una señal para iniciar la alimentación, en este caso podríamos esperar que fuese un estado de respuesta a un estrés crónico dado por la dieta HED, ya que sabemos que el receptor A1 ha sido principalmente asociado con neuroprotección, debido a que evita la excitabilidad neuronal dada por el ligando endógeno que actúa sobre el receptor A2a, inhibiendo la liberación de neurotransmisores como glutamato y debido a que la dieta HED, así como otros factores de estrés, promueven un aumento en la liberación de adenosina, se cree que este aumento descontrolado en la liberación de este neurotransmisor genere daño neuronal y el organismo promueve este aumento en la expresión del receptor A1 para evitar la muerte neuronal. Sin embargo, queda la duda de que pasa con el receptor A2a, porque bajo el fundamento anterior, el aumento de este receptor sería dañino para las neuronas hipotalámicas, pero en algunos estudios como lo es el Alzheimer, se aprovecha este daño ocasionado en el sistema adenosinérgico por

estrés crónico, para poder generar muerte neuronal en estructuras como hipocampo y obtener un modelo animal de estudio para esta patología, y se desarrolla de igual manera por una dieta alta en colesterol. Con lo que podemos decir que llegamos a un desequilibrio del sistema adenosinérgico en el hipotálamo de la rata, el cual podría estar contribuyendo al desarrollo de la obesidad, ya que el hipotálamo se encarga de, entre muchas otras funciones, regular el equilibrio homeostático así como regular el apetito.

La cafeína es una metilxantina que tiene su efecto en sistema nervioso central, antagonizando de forma no selectiva los receptores a adenosina. En este trabajo la cafeína demostró disminuir la expresión del gen ADORA1 y ADORA2a en hipotálamo de rata en un estado no obeso; en un estudio realizado en un modelo de apnea en ratas Sprague Dawley, se encontró que la exposición prenatal a cafeína promueve la disminución en la expresión génica de los receptores A1 y A2a, proponiéndose que la cafeína modifica epigenéticamente la expresión de estos genes (Gaytan y Pasaro, 2012), resultados que son consistentes con los nuestros, sin embargo, aún no se sabe cuál es el mecanismo por el cual se lleva a cabo esta regulación, pero se ha encontrado que la cafeína tiene la capacidad de regular la metilación del DNA.

Buscariollo y colaboradores demostraron que en tejido de músculo cardiaco la cafeína generaba un aumento en la metilación en regiones específicas del DNA y que esta hipermetilación estaba distribuida en mayor cantidad a nivel de gen, promotores y transcritos primarios; además demostraron la relación que existía entre estas modificaciones y los efectos post traduccionales que se reflejaban como una disminución de la cantidad de proteína de los genes analizados (Buscariollo y col., 2014), con lo que no podríamos descartar que la disminución en la cantidad de mRNA pueda estar dada por este mecanismo. Se tienen dos propuestas, en la cual se estipula que la cafeína al actuar sobre sus receptores, la vía de señalización promueve un aumento en la actividad de la DNA metiltransferasa o incluso proponen que la cafeína podría unirse a la enzima y así aumentar su actividad (Marques y col., 2011).

En los grupos de ratas que llevaron una dieta HED suplementada con cafeína ocurrió algo interesante, la cafeína inhibió que se llevará cabo el aumento en la expresión génica del receptor A1, el cual podría explicarse cómo se mencionó anteriormente, pero el receptor A2a no modificó su expresión. Hasta este momento pudiéramos pensar que el receptor que participa en la protección para la obesidad de acuerdo a la respuesta que tiene sobre la cafeína a nivel de gen es el receptor A1, pero es importante considerar que para la cuantificación de mRNA se utilizó todo el hipotálamo; es por eso que se decidió verificar que estaba pasando a nivel de proteína en un núcleo específico del hipotálamo, el núcleo paraventricular, que de acuerdo a los resultados obtenidos, nos podría dar respuesta de la selección de alimento, ya que en estas neuronas se expresa NPY.

Lo resultados que se obtuvieron por la técnica de inmunofluorescencia en PVN mostraron que la dieta HED promueve un aumento en la expresión del receptor A1, mientras que para el receptor A2a existe una disminución de la cantidad de fluorescencia emitida, este tipo de estudios no se habían reportado anteriormente, lo único que se había encontrado es que cambios en la restricción de comida podía ejercer cambios en la expresión del receptor A1 en todo el hipotálamo, pero no se había analizado en núcleos específicos. En este sentido, se ha demostrado que en estado de estrés crónico (dieta, hipoxia, etc.) existe un aumento en la liberación de adenosina, el ligando endógeno de los receptores analizados en este estudio, por lo que podríamos esperar que el aumento de los receptores A1 y la disminución del receptor A2a sea una respuesta fisiológica para evitar el daño que la adenosina pudiera ejercer activando al receptor A2A además en neuronas corticales se ha demostrado que el aumento de la concentración de adenosina en el medio promueve un aumento en la expresión del receptor A1 y una disminución del receptor A2a (Castillo, 2009) lo que podría apoyar los resultados encontrados en este estudio.

Sin embargo, la cafeína en un estado no obeso, no ejerció cambios significativos en la expresión proteica del receptor A1 ni A2a, pero se ve un tendencia a aumentar su expresión, resultados que concuerdan con lo reportado por Gaytan y Pasaro,

2012 estos autores realizaron un análisis cualitativo de la expresión del receptor A1 y A2a en algunos núcleos del hipotálamo, y en el PVN observan un ligero aumento en la expresión de ambos receptores. Al analizar la expresión proteica en las ratas que consumieron una dieta HED suplementada por cafeína, contrario a lo esperado por los resultados mostrados en la RT-qPCR, el receptor A1 no modifico su expresión por efecto de la cafeína, pero para el receptor A2a, la cafeína evito que se disminuyeran los niveles del receptor A2a en neuronas del PVN por efecto de la dieta HED.

Este núcleo está asociado principalmente con sistemas de recompensa, Yacoubi y colaboradores demostraron que el efecto de la cafeína en el consumo de líquido con azúcares estaba mediado por el receptor A2a, ellos realizaron modelos *KO* para el receptor A1 y el receptor A2a, y la cafeína en el ratón A1^{-/-} no ejerció cambios en el consumo de líquido con azúcares, sin embargo, para los ratones A2a^{-/-} la cafeína si modificó el comportamiento en el consumo, para esto los autores proponen que el efecto de la cafeína en sistema nervioso central está dado en su mayoría por el receptor A2a. Si consideramos esto, podríamos esperar que el efecto antagónico dado por la cafeína en el receptor A2a, que es un receptor acoplado a una subunidad alfa estimuladora, en PVN podemos regular el consumo de alimento “delicioso” (dieta HED), que podría dar apoyo al hecho de que las ratas no consumieron más grasa y por consecuente no desarrollaran obesidad. El receptor A2a se encuentra expresado en neuronas en PVN, lo que podría apoyar el que pueda o no regular la liberación de algunos neuropéptidos relacionados con la regulación de apetito.

Lo que podemos esperar con estos resultados, es que el sistema adenosinérgico si está involucrado en sistema nervioso central en procesos relacionados con la patología de la obesidad y que la cafeína, de acuerdo a las condiciones manejadas en este trabajo, puede modular el consumo de alimento de una HED, con un posible efecto en núcleos relacionados con apetito en el hipotálamo.

8. CONCLUSIONES

- Se logró inducir obesidad en ratas *Sprague Dawley* mediante una dieta alta en grasas y carbohidratos (HED).
- La cafeína disminuye la ganancia en peso de las ratas que consumen una dieta HED, sin embargo, no lo hace de forma significativa en las que reciben una dieta estándar.
- Se observó que las ratas que están expuestas a una dieta HED, consumen menor alimento que las que estuvieron expuestas a una dieta con menos calorías.
- La cafeína disminuyó el consumo de alimento de una dieta HED, pero no modifica la cantidad consumida de una dieta estándar.
- La cafeína no modifica el comportamiento en el consumo de líquido.
- Los niveles séricos de colesterol y glucosa no se ven modificados por la dieta HED ni la cafeína.
- En la rata sana, el mRNA del receptor A2a, presenta mayores niveles de expresión que el receptor A1.
- La cafeína promueve una disminución en la expresión génica de A1 y A2a en los grupos CTRL.
- La dieta HED promueve en hipotálamo total de rata, un aumento en la expresión de los genes ADORA1 y ADORA2a.
- Los niveles de mRNA del gen ADORA1 disminuyen su aumento dado por la dieta HED si esta va combinada con cafeína.
- Se encontró a los receptores A1 y A2a expresados en el PVN del hipotálamo de rata mediante inmunohistoquímica
- La inmunohistoquímica mostró un aumento en la expresión del receptor A1 y una disminución del receptor A2a en el PVN del hipotálamo, después de la exposición a una dieta alta en grasas.
- La cafeína inhibe que se lleve a cabo la disminución del receptor A2a en PVN dada por la dieta HED.

9. LITERATURA CITADA

- Archer, ZA, Rayner DV, Barret P, Balk A, Duncan JS, Moar KM, Mercer JG. 2005. Hypothalamic energy balance gene responses in the Sprague-Dawley rat to supplementation of high-energy diet with liquid ensure and subsequent transfer to chow. *J Neuroendocrinol.*, 17(11), pp.711-719.
- Bello, N. T. y Liang, N. 2011. The use of serotonergic drugs to treat obesity--is there any hope? *Drug design, development and therapy*, 5, pp.95–109.
- Borgers, AJ, Koopman KE, Bisschop PH, Serile MJ, Swaab DF, Fliers E, la Fleur SE, Alkemade A. 2014. Decreased serotonin transporter immunoreactivity in the human hypothalamic infundibular nucleus of overweight subjects. *Frontiers in neuroscience*, 8, p.106.
- Bouwknicht, JA, VAN DER Gughen J, Hijzen TH, Maes RA, Hen R, Olivier B. 2001. Male and female 5-HT 1B receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiology and behavior*, 74, pp.507–516.
- Brailowsky S., 2008. Las sustancias de los sueños: Neuropsicofarmacología. *Fondo de cultura economica*, 2da Edición.
- Bray, G. a y Ryan, D.H., 2014. Update on obesity pharmacotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311, pp.1–13.
- Breisch, ST, Zemlan, FP y Hoebel, BJ. 1976. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-Chlorophenylalanine. *Science*, 192, pp.382–385.
- Buckman, LB y Ellacott KL., 2014. The contribution of hypothalamic macroglia to the regulation of energy homeostasis. *Front Syst Neurosci.*, 8, pp. 212
- Burnstock, G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.*, 40(4), pp.668-688.
- Burnstock, G., 1972. Purinergic Nerves. *Pharmacological Reviews*, 24(3), pp.509-581.
- Burnstock, G., 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological reviews*, 87(2), pp.659–797.
- Burnstock, G., 2014. Introduction of purinergic signalling in the brain. *Glioma signaling*, 1, pp.1-12
- Buscariollo DL, Fang X, Greenwood V, Xue H, Rivkees SA, Wendler CC. 2014. Embryonic caffeine exposure acts via A1 adenosine receptors to alter adult cardiac function and DNA methylation in mice. *PLoS One*, 9(1), pp.e87547.
- Chen, J. F., Lee, C. F. y Chern, Y., 2014. *Adenosine receptor neurobiology: overview*. 1st ed., Elsevier Inc.

- Cheng, H. C., Shih, H. M., y Chern, Y. 2002. Essential role of cAMP-response elementbinding protein activation by A2A adenosine receptors in rescuing the nerve growth factor-induced neurite outgrowth impaired by blockage of the MAPK cascade. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33), pp.930–942.
- Davidson, MH, Hauptman J, DiGirolamo M, Foreyt JP, Halsted CH, Heber D. Heimburger DC, Lucas CP, Robbins DC, Chung J, Haymsfield SB. 1999. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *JAMA*, 281(3), pp. 235-242
- Dixon, AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. 1996. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *British journal of pharmacology*, 118(6), pp.1461–1468.
- Doddi, C., y Dobson, J. G., Jr. (2010). Myocardial adenosine A(1)-receptor-mediated adenoprotection involves phospholipase C, PKC-epsilon, and p38 MAPK, but not HSP27. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 298(1), pp. 671–678.
- Donovan, M. H. y Tecott, L. H., 2013. Serotonin and the regulation of mammalian energy balance. *Frontiers in neuroscience*, 7, p.36.
- Drury A. N. y Szent-Györgyi A., 1929. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.*, 68(3), pp.213-237.
- ENSANUT, 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, Sobrepeso y Obesidad en adulto. Resultados Nacionales 2012 [Online]. Available: <http://ensanut.insp.mx/informes/ENSANUT2012ResultadosNacionales.pdf>
- Fredholm, BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews*, 53(4), pp.527–52.
- Fredholm, BB. 2003. Pharmacology of adenosine A2A receptors and therapeutic applications. *Curr Top Med Chem.*, 3(4), pp.413-426.
- Fredholm, BB., IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. 2011. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors — An Update. *Pharmacology Review*, pp.1–34.
- Gao, Z.-G. y Jacobson, K.A., 2011. Emerging adenosine receptor agonists-an update. *Expertal Opinion Emergent Drugs*, 16(4), pp.597–602.
- Gaytan S. P. y Pasaro R., 2012. Neonatal caffeine treatment up-regulates adenosine receptors in brainstem and hypothalamic cardio-respiratory related nuclei of rat pups. *Experimental Neurology.*, 237(2), pp.247-259.
- Gharibi, B. Abraham AA, Ham J, Evans BA. 2012. Contrasting effects of A1 and A2b adenosine receptors on adipogenesis. *International Journal of Obesity (Lond)*, 36(3), pp.397-406.

- George A. B., y Donna H. R., 2014. Update on obesity pharmacotherapy. *Obesity pharmacotherapy*, 13(11), pp. 1-13
- Halford, J. y Blundell, J.E., 1996. The 5-HT B Receptor Agonist CP-94 , 253 Reduces Food Intake and Preserves the Behavioural Satiety Sequence. *Physiology and behavior*, 60(10), pp.933–939.
- Heal, DJ, Smith SL, Fisas A, Codony X, Buschmann H. 2008. Selective 5-HT₆ receptor ligands: progress in the development of a novel pharmacological approach to the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Pharmacology and therapeutics*, 117(2), pp.207–31.
- Higgs, S., Cooper, AJ. y Barnes, NM., 2011. Reversal of sibutramine-induced anorexia with a selective 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Psychopharmacology*, 214(4), pp.941–7.
- Holton, P., 1959. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *Journal of Physiology*. 145(3), pp.494-504.
- Hursel, R. y Westerterp-Plantenga MS., 2013. Catechin- and caffeine-rich teas for control of body weight in humans. *Am J Clin Nutr.*, 98(6), 1682s-1683s.
- Jajoo, S, Mukherjea D. Kumar S, Sheth S, Kaur T, Rybak LP, Ramkumar V., 2010. Role of beta-arrestin1/ERK MAP kinase pathway in regulating adenosine A1 receptor desensitization and recovery. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 298(6), 56–65.
- Jinka TR, Carlson ZA, Moore JT, Drew KL. 2010. Altered thermoregulation via sensitization of A1 adenosine receptors in dietary-restricted rats. *Psychopharmacology (Berl.)*, 209(3), pp.217-224.
- Keegan, A. Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, MacLean MR. 2001. Contribution of the 5-HT_{1B} Receptor to Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension: Converging Evidence Using 5-HT_{1B}-Receptor Knockout Mice and the 5-HT_{1B/1D}-Receptor Antagonist GR127935. *Circulation Research*, 89(12), pp.1231–1239.
- Kenneth A., J. y Zhan-Guo, G., 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature reviews*, 5(3), pp.247–264.
- Kirsch, GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. 1990. Coupling of ATPsensitive K⁺ channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *The American Journal of Physiology*, 259(8), pp.20–26.
- Langemeijer, EV., Verzijl D, Dekker SJ, Ijzerman AP. 2013. Functional selectivity of adenosine A1 receptor ligands?. *Purinergic Signal.*, 9(1), pp.91-100.
- Linden, J., 1994. Cloned adenosine A₃ receptors: Pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 15(8), pp.298–306.
- Liu, Z. W., y Gao, X. B., 2007. Adenosine inhibits activity of hypocretin/orexin neurons by the A1 receptor in the lateral hypothalamus: A possible sleep-promoting effect. *Journal of Neurophysiology*, 97(3), pp. 837–848.

- Liu, A. M., y Wong, Y. H., 2004. G16-mediated activation of nuclear factor kappaB by the adenosine A1 receptor involves c-Src, protein kinase C, and ERK signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), pp. 196–204.
- Lopez-Esparza S., Berumen LC, Padilla K, Miledi R, García-Alcocer G. 2015. Expression of hippocampal serotonin receptors 5-HT2C and 5-HT5A in a rat model of diet-induced obesity supplemented with tryptophan. *Int J Dev Neurosci*, 42, pp. 80-85.
- Lutz, T. A. y Woods S. C., 2012. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol.*, 5, pp.e61.
- Mahan, LC, McVittie LD, Smyk-Randall EM, Nakata H, Monsma FJ, Gerfen CR, Sibley DR., 1991. Cloning and expression of an A1 adenosine receptor from rat brain. *Molecular Pharmacology*, 40(3), pp. 1–7.
- Mendiola-Précoma J, Padilla K, Rodríguez-Cruz A, Berumen LC, Miledi R, García Alcocer G. 2016 *Journal of Alheimers Disease*, en prensa.
- Moy, G. A. y McNay, E. C., 2013. Caffeine prevents weight gain and cognitive impairment caused by a high-fat diet while elevating hippocampal BDNF. *Physiol Behav.*, 109, pp.69-74.
- Marques CJ, João Pinho M, Carvalho F, Biéche I, Barros A, Sousa M., 2011. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. *Epigenetics*, 6(11), pp.1354-1361.
- Murphy, D.L. y Lesch, K.-P., 2008. Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(2), pp.85–96.
- Nabekura, J. y Akaike N., 2003. Adenosine A1 receptor-mediated presynaptic inhibition of GABAergic transmission in immature rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol.*, 89(3), pp.1214-1222.
- Nakajima K, Cui Z, Li C, Meister J, Cui Y, Fu O, Smith AS, Jain S, Lowell BB, Krashes MJ, Wess J. 2016. Gs-coupled GPCR signalling in AgRP neurons triggers sustained increase in food intake. *Nat Commun.*, 7, pp.10268.
- OECD, 2014. OECD Obesity Update 2014 [Online]. Available: <http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm>
- Okada M., Kawata Y, Murakami T, Wada K, Mizuno K, Kaneko S. 1999. Adenosine A1 and A2 receptors modulate extracellular dopamine levels in rat striatum. *Neurosci Lett*, 212(6), pp.53–56.
- Okada, M. Nutt DJ, Murakami T, Zhu G, Kamata A, Kawata Y, Kaneko S. 2001. Adenosine receptor subtypes modulate two major functional pathways for hippocampal serotonin release. *J Neurosci.* 21(2), pp.628-640.
- Okada, M., Zhu G, Yoshida S, Iwasa H, Kaneko S. 2002. Mechanisms of interaction between adenosine receptor subtypes on hippocampal serotonin release. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, 22(2), pp.61-69.

- OMS, 2015. Organización Mundial de la Salud, Obesidad y sobrepeso [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> 2014].
- Panchal, SK, Pudyal H, Waanders J, Brown L., 2012. Coffee extract attenuates changes in cardiovascular and hepatic structure and function without decreasing obesity in high-carbohydrate, high-fat diet-fed male rats. *Journal of Nutrition*, 142(2), pp. 690-697
- Parsons, L.H., Weiss, F. y Koob, G.F., 1997. Serotonin 1B Receptor Stimulation Enhances Cocaine Reinforcement. *Neuroscience*, 18(23), pp.10078–10089.
- Peters, A. Pellerin L, Dallman MF, Ottmanns KM, Schwiger U, Born J, Fehm HL. 2007. Causes of obesity: looking beyond the hypothalamus. *Progress in neurobiology*, 81(2), pp.61–88.
- Rebola, N. Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA. 2003. Subcellular localization of adenosine A(1) receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Research*, 987(7), pp.49–58.
- Rebola, N., Rodrigues RJ, Lopes LV, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. 2005. Adenosine A1 and A2A receptors are co-expressed in pyramidal neurons and co-localized in glutamatergic nerve terminals of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 133(8), pp.79–83.
- Rothman, R.B. et al., 2000. Evidence for Possible Involvement of 5-HT2B Receptors in the Cardiac Valvulopathy Associated With Fenfluramine and Other Serotonergic Medications. *Circulation*, 102(23), pp.2836–2841.
- Robeva, A., et al., 1998. Immunohistochemical localization of adenosine A2A receptors in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 401(5), 163–186.
- Rustenbeck, I, Lier-Glaubitz V, Willenborg M, Eggert F, Engelhardt U, Jörns A. 2014. Effect of chronic coffee consumption on weight gain and glycaemia in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Nutrition & Diabetes*, 4, pp.e123
- Saller, C.F. y Stricker, E.M., 1976. Hyperphagia and Increased Growth in Rats After. *Science*, 81(April), pp.1974–1976.
- Sargent, B.J. y Henderson, A.J., 2011. Targeting 5-HT receptors for the treatment of obesity. *Current opinion in pharmacology*, 11(1), pp.52–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330209> [Accessed October 12, 2014].
- Sawynok, J., 2011. Caffeine and pain. *Pain*, 152(1), pp.726-729.
- Spanswick, D, Smith MA, Mirshamisi S, Routh VH, Ashford ML. 2000. Insulin activates ATP-sensitive K+ channels in hypothalamic neurons of lean, but not obese rats. *Nat Neurosci.*, 3(8), pp.757-758.
- Steiner, J. a, Carneiro, A.M.D. y Blakely, R.D., 2008. Going with the flow: trafficking-dependent and -independent regulation of serotonin transport. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 9(9), pp.1393–402.

- Sutcliffe, J. y Delahanty, R., 2005. Allelic Heterogeneity at the Serotonin Transporter Locus (SLC6A4) Confers Susceptibility to Autism and Rigid-Compulsive Behaviors. *The American Journal of Human Genet.*, 77, pp.265–279.
- Tofovic, SP, Kost CK Jr, Jackson EK, Bastacky SI. 2002. Long-term caffeine consumption exacerbates renal failure in obese, diabetic, ZSF1 (fa-fa(cp)) rats. *Kidney Int.*, 61(4), pp.1433-1444.
- Velloso, LA. y Schwartz MW. 2011. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *International Journal of Obesity.*, 35, pp. 1455-1465.
- Verty AN, McGregor IS, Mallet PE. 2005. Paraventricular hypothalamic CB(1) cannabinoid receptors are involved in the feeding stimulatory effects of Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology*, 49(8), pp.1101-1109.
- Waltereit, R. y Weller, M., 2003. Signaling from cAMP/PKA to MAPK and synaptic plasticity. *Molecular Neurobiology*, 27(14), pp.99–106.
- Wirtshafter, D. y Klitenick, M.A., 1988. Is Dopamine Involved in the Hyperactivity Produced by Injections of Muscimol Into the Median Raphe Nucleus? *Pharmacology Biochemistry*, 30(0091-3057), pp.577–583.
- Yacoubi ME, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. 2003. Caffeine reduces hypnotic effects of alcohol through adenosine A2A receptor blockade. *Neuropharmacology*, 7, pp.977-985.
- Yamada, J., Sugimoto, Y. y Ujikawa, M., 2006. Involvement of Leptin in Hypophagia Induced by the Serotonin Precursor 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) in Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(March), pp.557–559.
- Zhang, L., y Feng, L. Y., 2013. Modulation of A(2)a receptor antagonist on D(2) receptor internalization and ERK phosphorylation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34, 1292–1300.
- Zhang, X. Gainetdinov TT, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Krihnan KR, Caron MG. 2005. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*, 45(1), pp.11–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629698> [Accessed October 18, 2014].
- Zhou, QY, Lic C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. 1992. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A3 adenosine receptor. ,*Proccedings National Academic of Science USA*. pp.7432–7436.
- Zhu, CB, Hewlett WA, Feoktistov I, Biaggioni I, Blakely RD. 2004. Adenosine Receptor , Protein Kinase G , and p38 Mitogen- Activated Protein Kinase- Dependent Up-Regulation of Serotonin Transporters Involves Both Transporter Trafficking and Activation. *Molecular Pharmacology*, 5(10), pp.1462–1474.
- Zhu, CB, Lindler KM, Campbell NG, Sutcliffe JS, Hewlett WA, Blakely RD. 2011. Colocalization and Regulated Physical Association of Presynaptic Serotonin Transporters with A 3 Adenosine. *Molecular Pharmacology*, 80(3), pp.458–465.

Zimmermann GS, Bastos MF, Diaz Goncalves TE, Chambrone L, Duarte PM. 2012. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic signal*, 8(3), pp.437-502

ANEXO I

EXTRACCIÓN DE RNA PARA TEJIDO (MagNA Pure Compact Roche®)

PRINCIPIO



Principio

El procedimiento de aislamiento de ARN se basa en Magnetic Particle Technology Pure Glass MagNA

Los pasos principales del aislamiento puro del ARN total compacto con MagNA son:

- Las muestras de tejido se rompen y las células o glóbulos blancos homogeneizados o cultivadas son pre-lisadas fuera del instrumento.
- El homogeneizado de la muestra o la sangre entera se lisan mediante incubación con el buffer de lisis que contiene una sal caotrópica y proteinasa K, que destruye las proteínas restantes incluyendo nucleasas.
- Las partículas Magnetic Glass (MGP) se añaden y los ácidos nucleicos se inmovilizan en las superficies de las MGPS.
- El ADN genómico se degrada por incubación con DNAsa. Esto reduce sustancialmente el contenido de ADN de la muestra.

- Sustancias no unidas (por ejemplo, proteínas, restos celulares, inhibidores de la PCR, etc.) se eliminan mediante varias etapas de lavado.
- RNA total purificado se eluye de los POP.

MATERIAL

- DNAsa
- Cartuchos
- Tip Try (Puntas para el equipo)
- Buffer de lisis
- Tubos de muestra
- Tubos de elución
- Tapas tubos de elución
- Alcohol 70%
- SDS 1%
- Micropipetas (10, 20, 200 μ l)
- Jeringas (3ml aguja verde)
- Tijeras
- Marcador
- Sanitas
- Puntas de 1mL
- Puntas de 100 μ l



Fig. 2 Material necesario para llevar a cabo la extracción de RNA

RECOMENDACIONES

- Utilizar tejido entre 2.5-10mg, mayor a este peso podemos bloquear el equipo debido a la viscosidad.
- Utilice sólo muestras de tejidos que han sido congelados en nitrógeno líquido inmediatamente después de la escisión o tratados con un agente estabilizador, por ejemplo RNAlater.
- Antes de añadir el buffer de lisis a la muestra de tejido, asegúrese de que sigue siendo completamente congelado y procesar de inmediato.
- Homogeneización del material de muestra es esencial para el aislamiento de RNA intracelular a partir de tejidos. Una mala homogeneización se traducirá en una reducción significativamente en los rendimientos de ARN.

ANTES DE COMENZAR

- Prender el equipo y limpiarlo con etanol antes de la calibración y la exposición a la UV

- Prender la lámpara UV y dejarla 1 hora

Mientras transcurre este tiempo:

- Asegurarse de tener todo el material listo.
- Limpiar toda el área de trabajo, primero con SDS y después con etanol.
- Equilibrar el cartucho y el buffer de lisis de 15 a + 25 °C antes de su uso.

LISIS DEL TEJIDO

- Adicionar 450µl de buffer de lisis en un tubo, después agregar los 10mg de tejido en este tubo. Ayudar a homogeneizar el tejido con ayuda de una jeringa
- Incubar por 30 minutos a 15-25°C
- Centrifugar durante 2 minutos a 13 000g a 15-25°C
- Trasferir 350µl del sobrenadante en un tubo de muestra
- Colocar el tubo de muestra en la gradilla de muestras e iniciar el protocolo de extracción de RNA como se describe en a continuación

PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE RNA EN MAGNA PURE COMPACT ROCHE®

- Encender interruptor del equipo
- Remover el Rack del cartucho y el Rack de los tubos (con el Rack de los tubos de elución)
- Limpiar con etanol al 70% en DEPC el equipo
- Encender el equipo en el botón Run y esperar a que se calibre
- Una vez calibrado encender la lámpara UV y dejarla por una hora, al finalizar dejar ligeramente abierta la puerta para dejar que se escape el exceso de O3 formado.
- Asegurarse de que en este momento el cartucho ya se esté atemperando
- Escanear el código de barras de los cartuchos e insertar los cartuchos en el rack de cartuchos. Con los dos pozos aislados apuntando lejos de usted,

inserte todos los pozos en el cartucho de reactivos en los agujeros en el bastidor del cartucho.

- Proceder a ordenar las muestras Pantalla 2.
- Seleccione el protocolo de purificación adecuada en el menú Protocolo.
- Seleccione el volumen de elución (50µl ó 100µl).
- Insertar el número apropiado de Tip Trays (puntas), una por cada purificación, en la posición asignada en el Try Rack del instrumento y presionar siguiente.
- Poner 20µl de la DNasa en la parte inferior de un tubo de muestra (un tubo por purificación). Insertar los tubos de muestras abiertos que contienen la solución de DNasa en la fila 2 (por lo general la posición dedicada para el Control Interno CI) de la gradilla.
- Capturar en el nombre de la muestra.
- Colocar los tubos de muestras que contienen la muestra en el soporte de tubos (asegúrese de que el borde de los tubos están sentados firmemente en la gradilla).
- Escanear los tubos de elución y colocarlos en la gradilla (E).
- Agitar nuevamente los cartuchos que se encuentran ya en el rack
- Insertar la gradilla de los tubos en el instrumento
- En la pantalla de confirmación, revise la pantalla de información. Si la información es correcta, confírmela pulsando el botón "Confirm Data", cierre la cubierta frontal.
- Presionar START

RECOMENDACIONES PARA EL CARTUCHO

- Retirar un cartucho de reactivos precargada del blister.
- Equilibrar el cartucho de reactivos para 15 a + 25 ° C (30 min).

Manejar cada reactivo cartucho antes del uso de la siguiente manera:

- Usar siempre guantes al manipular el cartucho compacto Pure Magna.

- Evitar tocar la lámina de sellado que cubre los pocillos de cartucho.
- Evitar tocar los dos pozos abiertos individuales y no utilizarlos como asas.
- Evite la formación de espuma.
- Dejar que el líquido dentro de los pozos de cartucho asiente de nuevo por completo. Si el fluido permanece bajo la lámina de sellado, golpear la parte inferior del cartucho suavemente en una superficie plana de laboratorio.

AL FINALIZAR

- Después de la carrera de purificación ha terminado, aparece la pantalla de resultados, que muestra el resultado del proceso de aislamiento para cada canal:
- El resultado será PASS si el plazo de aislamiento se completó sin ningún tipo de advertencia o de error.
- Para cada resultado de FALLO, la pantalla de resultados mostrará un breve error o mensajes de advertencia para ayudarle a decidir si puede ignorar el error o advertencia. Consulte la sección de solución de problemas del Manual del MagNA puro del operador compacto.

AL FINALIZAR CUANTIFICAR LA CONCENTRACIÓN DE RNA OBTENIDO Y VERIFICAR LOS RATIOS