

Desarrollo temprano, distribución tisular y dimorfismo sexual del sistema TRHérgico en el pez cebra (*Danio rerio*): implicaciones en la regulación de la glucemia

MSC. David Salvador
Díaz Ortegón



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA



Tesis

Desarrollo temprano, distribución tisular y dimorfismo sexual del sistema TRHérgico en el pez cebra (*Danio rerio*): implicaciones en la regulación de la glucemia

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias en Biomedicina

Presenta

M.S.C. David Salvador Díaz Ortegón

Dirigido por:

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez

Codirector:

Dr. en C. Iván Lazcano Sánchez

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



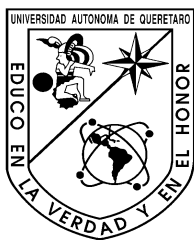
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina
Doctorado en Ciencias en Biomedicina



Desarrollo temprano, distribución tisular y dimorfismo sexual del sistema
TRHérgico en el pez cebra (*Danio rerio*): implicaciones en la regulación de la
glucemia

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biomedicina

Presenta:

M.S.C. David Salvador Díaz Ortegón

Dirigido por:

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez

Codirigido por:

Dr. en C. Iván Lazcano Sánchez

Comité Tutorial:

Dra. en C. María Carlota García Gutiérrez
Presidente

Dr. en C. Iván Lazcano Sánchez
Secretario

Dra. en C. Ana Gabriela Hernández Puga
Vocal

Dra. en C. Ana Alicia Sánchez Tusie
Suplente

Dr. en C. Santiago Martín Pech Pool Suplente
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (octubre 2025) México
14 de Marzo del 2026

Dedicatoria

A mi esposa, Sarah Nicole Lee Martínez,
mi mejor decisión y el regalo más hermoso de este camino.
Gracias por caminar a mi lado con amor, fortaleza y fe.

A mi madre, mi guerrera incansable,
por tu apoyo inagotable y tu amor que nunca falla.

A mi padre, mi ángel en el cielo,
porque tus palabras siguen guiando mi carácter y mi esfuerzo.

A mi hermano, compañero de vida,
por tu respaldo constante y tu lealtad sin límites.

Este logro es de ustedes.
Los amo.

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias al apoyo institucional, académico y personal de diversas instancias y personas que contribuyeron de manera significativa al desarrollo de este proyecto.

En primer lugar, agradezco a Dios por la vida, la fortaleza y la claridad en los momentos de incertidumbre. Su presencia ha sido mi guía y mi sustento constante a lo largo de esta experiencia de vida llamada doctorado.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo financiero otorgado durante mis estudios doctorales, el cual hizo posible mi formación académica y la consolidación de esta investigación (No. CVU 925987).

Expreso mi profundo agradecimiento a la Universidad Autónoma de Querétaro, particularmente a la Facultad de Medicina y al Programa de Doctorado en Ciencias en Biomedicina, por la formación rigurosa y el acompañamiento institucional que fortalecieron de manera decisiva mi desarrollo como investigador.

De igual manera, manifiesto mi más sincero reconocimiento al Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), especialmente al Laboratorio D03 de Receptores Nucleares y Neurobiología, por proporcionarme los espacios académicos, los recursos técnicos y un entorno científico de excelencia que enriquecieron sustancialmente el desarrollo experimental de esta investigación.

De manera muy especial, agradezco profundamente a la Dra. María Carlota García y al Dr. Iván Lazcano, cuya guía científica, criterio académico y confianza constante fueron pilares fundamentales durante este proceso. Serán para toda la vida referentes en mi desempeño como investigador.

Asimismo, extendiendo mi reconocimiento al Dr. Pablo, a la Dra. Áurea, al Dr. Santiago, a la Dra. Aurora, a la Dra. Gaby, a la Dra. Ana, a la Dra. Haydé y a la Dra. Isela, cuyas enseñanzas y acompañamiento enriquecieron este camino tanto en lo académico como en lo humano.

A mis amigos, colegas y compañeros de laboratorio, gracias por el apoyo técnico, las discusiones enriquecedoras y el ambiente de colaboración que hicieron de este camino una experiencia inolvidable.

Finalmente, a mi familia, mi gratitud más profunda. Gracias por sostenerme cuando el cansancio pesaba, por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por su paciencia silenciosa y su amor incondicional. Este logro no me pertenece únicamente a mí; es también fruto de sus sacrificios, de su fe y de la fuerza que siempre me han transmitido.

Gracias infinitas...

Índice General

1. Introducción	12
2. Antecedentes Generales	13
2.1 La Diabetes Mellitus tipo 2: panorama epidemiológico	13
2.2 Papel fisiológico de la insulina	16
2.3 Fisiopatología de la DM2	20
2.4 Tratamiento farmacológico de la DM2: terapias convencionales y emergentes	23
2.5 La hormona liberadora de tirotropina (TRH) y sus elementos de señalización: el sistema TRHérgico.....	25
3. Antecedentes Particulares.....	31
3.1 Distribución filogenética y anatómica del sistema TRHérgico	31
3.2 Ontogenia del sistema TRHérgico durante el desarrollo temprano	32
3.3 Rol de la TRH en el páncreas y su implicación en la homeostasis glicémica.....	33
3.4 El pez cebra como modelo experimental para el estudio del sistema TRHérgico y su papel en la regulación de la homeostasis glicémica	35
4. Justificación	38
5. Preguntas de investigación.....	39
6. Hipótesis de investigación	39
7. Objetivo General.....	39
7.1 Objetivos Específicos.....	39
8. Metodología	40
8.1 Diseño del estudio.....	40
8.2 Modelo animal.....	40
8.3 Consideraciones bioéticas y de bioseguridad	41
8.4 Diseño Experimental	42
8.4.1 <i>Objetivo Específico 1.</i> Análisis bioinformático de las secuencias del sistema TRHérgico	42
8.4.2 <i>Objetivos Específicos 2 y 3.</i> Evaluación de la expresión relativa durante el desarrollo temprano y en tejidos adultos, diferenciada por sexo	43
8.4.3 <i>Objetivo Específico 4.</i> Evaluar el efecto de la TRH en un modelo de hiperglicemia en el pez cebra adulto	44
8.5 Análisis de expresión génica relativa por RT-qPCR	48
8.6 Análisis estadístico.....	51
9. Resultados.....	52
9.1 Caracterización <i>in silico</i> de las proteínas del sistema TRHérgico en el pez cebra ...	52

9.2 Análisis ontogénico de la expresión de <i>trh</i> , <i>trh-rs</i> y <i>trh-de</i> en el pez cebra	62
9.3 Perfil tisular y dimorfismo sexual en la expresión de <i>trh</i> , <i>trh-rs</i> y <i>trh-de</i> en el pez cebra adulto	63
9.4 Efecto de la TRH sobre los niveles de glucosa en sangre en un modelo de hiperglicemia	67
9.5 Expresión génica del sistema TRHérgico y del metabolismo de la glucosa por la TRH.....	68
10. Discusión	75
10.1 Conservación evolutiva e integridad estructural del sistema TRHérgico en el pez cebra	75
10.2 Expresión ontogenética de los genes del sistema TRHérgico durante el desarrollo temprano.....	76
10.3 Distribución central y periférica de los componentes TRHérgicos en el pez cebra adulto	77
10.4 Dimorfismo sexual en el sistema TRHérgico	79
10.5 Respuesta hipoglicemiante dependiente del sexo a la TRH bajo condiciones de desafío metabólico	81
10.6 Regulación transcripcional asociada a la modulación metabólica mediada por la TRH.....	82
10.7 Alcances y perspectivas del estudio	84
11. Conclusiones	85
12. Referencias bibliográficas.....	86
13. Anexos.....	107

Índice de Tablas

Tabla 1. Diferencias entre hombres y mujeres en la epidemiología, comorbilidades, evolución clínica y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.....	15
Tabla 2. Receptores de la hormona liberadora de tirotropina (TRH-R): similitudes y diferencias	30
Tabla 3. Números de acceso de las secuencias proteicas de los componentes del sistema TRHérgico de los vertebrados	42
Tabla 4. Diseño experimental del tratamiento <i>in vivo</i> con TRH sobre el modelo hiperglicémico del pez cebra.....	50
Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de genes del sistema TRHérgico y genes relacionados con el metabolismo glicémico.....	49
Tabla 6. (Anexo) Secuencias de los cebadores y parámetros de validación por qPCR de los genes diana analizados en este estudio.	1143

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la insulina madura.....	17
Figura 2. Eje hipotálamo-Hipófisis-Tiroides.....	26
Figura 3. Estructura del gen humano pp _{trh}	27
Figura 4. Alineamiento comparativo de las secuencias putativas de aminoácidos de la pre proTRH en vertebrados.	52
Figura 5. Alineamiento comparativo de las secuencias putativas de los aminoácidos de los TRH-Rs en vertebrados.	55
Figura 6. Alineamiento comparativo de las secuencias putativas de aminoácidos de la TRH-DE en vertebrados.	58
Figura 7. Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de TRH, TRH-Rs y TRH-DE.	59
Figura 8. Representación esquemática de la organización molecular del sistema TRHérgico en el pez cebra.	60
Figura 9. Expresión relativa de trh, trh-rs y trh-de durante el desarrollo temprano del pez cebra.	61
Figura 10. Expresión relativa del ARNm de trh en diferentes tejidos de peces cebra machos y hembras.	63
Figura 11. Expresión relativa de los transcritos de los receptores de TRH en tejidos de pez cebra.	64
Figura 12. Expresión relativa de trh-de en tejidos de pez cebra.....	65
Figura 13. Efecto de la administración de la TRH sobre la glicemia en peces cebra adultos en un modelo de hiperglicemia..	66
Figura 14. Expresión relativa del ARNm de la insulina y de los componentes del sistema TRHérgico en el páncreas de peces cebra adultos machos y hembras.	68
Figura 15. Expresión relativa del ARNm de los transportadores de glucosa e isoformas del receptor de insulina en el hígado de peces cebra adultos machos y hembras.	69
Figura 16. Expresión relativa del ARNm de los componentes del sistema TRHérgico en el hígado de peces cebra adultos machos y hembras.	71
Figura 17. Expresión relativa de ARNm de genes del metabolismo glicémico y de trh-de en el músculo de peces cebra adultos machos y hembras.	72
Figura 18. (Anexo) Localización visceral del tejido pancreático en el pez cebra adulto...107	
Figura 19. (Anexo) Identificación del tejido pancreático en cortes histológicos de pez cebra adulto teñidos con hematoxilina y eosina.....108	
Figura 20. (Anexo) Detección de insulina en tejido pancreático de pez cebra adulto mediante inmunofluorescencia y análisis de los transcritos insa y gcgb por RT-PCR109	
Figura 21. (Anexo) Ensayo dosis–respuesta del efecto de la TRH sobre los niveles de glucosa en sangre en pez cebra adulto.110	
Figura 22. (Anexo). La administración <i>ip</i> de insulina reduce los niveles de glicemia en peces cebra con hiperglicemia.....112	

Abreviaturas y Siglas

18S: ARN ribosomal 18S	ND: No detectable
actb / β -actina: Beta actina	NOM: Normas Oficiales Mexicanas
ADA: Asociación Americana de Diabetes (<i>American Diabetes Association</i>)	PBS: Solución amortiguadora de fosfatos
ADN / DNA: Ácido desoxirribonucleico	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
ARN / RNA: Ácido ribonucleico	qPCR / RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcripción reversa
ARNm / mRNA: Ácido ribonucleico mensajero	SEM: Error estándar de la media (<i>Standard Error of the Mean</i>)
cDNA / DNAc: ADN complementario	SLC2A: Familia de portadores de solutos tipo 2 (<i>Solute Carrier Family 2; transportadores de glucosa</i>)
Ct: Ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)	SNC: Sistema nervioso central
DE: Desviación estándar	TRH: Hormona liberadora de tirotropina (<i>Thyrotropin-Releasing Hormone</i>)
DM: Diabetes mellitus	TRH-DE: Enzima degradadora de la TRH
DM2: Diabetes mellitus tipo 2	TRH-R: Receptor de la hormona liberadora de tirotropina
dpf: Días post-fertilización (<i>days post fertilization</i>)	TRH-R1a: Isoforma 1a del receptor de TRH
ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	TRH-R1b: Isoforma 1b del receptor de TRH
GI: Gastrointestinal	TRH-R2: Isoforma 2 del receptor de TRH
GPA: Glucosa plasmática en ayuno	TRH-R3: Isoforma 3 del receptor de TRH
HbA1c: Hemoglobina glicada	TSH: Tirotropina
HHT: Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	UAQ: Universidad Autónoma de Querétaro
hpf: Horas post-fertilización (<i>hours post fertilization</i>)	UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México
HT: Hormonas tiroideas	INb: Instituto de Neurobiología
IDF: Federación Internacional de Diabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)	Δ Ct: Diferencia de ciclos umbral
IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social	$\Delta\Delta$ Ct: Método de doble delta Ct para cuantificación relativa de expresión génica
INS-R: Receptor de insulina	
IR: Resistencia a la insulina	
lsm12b: Gen de referencia LSM12 homolog B	

Resumen

Introducción. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constituye un reto global de salud pública, caracterizado por hiperglicemia persistente y resistencia a la insulina. Esta condición ha impulsado la búsqueda de nuevos mecanismos reguladores de la homeostasis glicémica que permitan ampliar el entendimiento fisiopatológico y explorar posibles estrategias terapéuticas. En este contexto, la hormona liberadora de tirotropina (TRH), junto con sus receptores (TRH-R) y la enzima degradadora de TRH (TRH-DE), emerge como un sistema peptidérgico con potencial participación periférica en la regulación metabólica.

Objetivo. El objetivo de esta tesis fue caracterizar integralmente el sistema TRHérgico en el pez cebra (*Danio rerio*) en ambos sexos, analizando su conservación evolutiva, expresión ontogenética y tisular, dimorfismo sexual y función en la regulación del metabolismo de la glucosa bajo condiciones fisiológicas y de hiperglicemia.

Metodología. Se realizó un análisis bioinformático comparativo de las secuencias de preproTRH, TRH-Rs y TRH-DE en vertebrados, incluido el humano. Posteriormente, se evaluó la expresión génica durante el desarrollo temprano (0–5 días post-fertilización) y en tejidos centrales y periféricos de peces adultos mediante RT-qPCR. Para el análisis funcional, se empleó un modelo *in vivo* de hiperglicemia en pez cebra adulto, evaluando niveles de glucosa en sangre y la expresión de genes asociados al sistema TRHérgico y a la señalización insulínica en páncreas, hígado y músculo.

Resultados. Los resultados demostraron que el sistema TRHérgico se encuentra altamente conservado en el pez cebra. Durante el desarrollo temprano, la isoforma *trh-r1b* presentó la mayor abundancia transcripcional. En adultos, el sistema mostró amplia distribución tisular, con mayor expresión en cerebro y retina, así como diferencias sexo-dependientes en tejidos periféricos. En el modelo de hiperglicemia, la administración de TRH indujo un efecto hipoglicemiante en machos y moduló la expresión génica en tejidos metabólicamente activos. Este efecto no se asoció con un incremento directo de la transcripción de la insulina, sino con una modulación transcripcional orientada a preservar la integridad funcional bajo estrés metabólico.

En conjunto, estos hallazgos posicionan al sistema TRHérgico como un modulador periférico, funcional y sexo-dependiente de la homeostasis glicémica, con potencial relevancia terapéutica en la DM2.

Abstract

Introduction. Type 2 diabetes mellitus (T2DM) represents a major global public health challenge, characterized by persistent hyperglycemia and insulin resistance. This condition has driven the search for novel regulatory mechanisms involved in glycemic homeostasis to expand pathophysiological understanding and explore potential therapeutic strategies. In this context, thyrotropin-releasing hormone (TRH), together with its receptors (TRH-Rs) and the TRH-degrading enzyme (TRH-DE), emerges as a peptidergic system with potential peripheral involvement in metabolic regulation.

Objective. The aim of this thesis was to comprehensively characterize the TRHergic system in zebrafish (*Danio rerio*) in both sexes, analyzing its evolutionary conservation, ontogenetic and tissue-specific expression, sexual dimorphism, and functional role in glucose metabolism under physiological and hyperglycemic conditions.

Methodology. A comparative bioinformatic analysis of preproTRH, TRH-Rs, and TRH-DE sequences was performed across vertebrates, including humans. Gene expression was subsequently evaluated during early development (0–5 days post-fertilization) and in central and peripheral tissues of adult zebrafish using RT-qPCR. For functional assessment, an *in vivo* hyperglycemia model was implemented in adult zebrafish to measure blood glucose levels and the expression of genes associated with the TRHergic system and insulin signaling in pancreas, liver, and muscle.

Results. The findings demonstrated that the TRHergic system is highly conserved in zebrafish. During early development, the *trh-r1b* isoform showed the highest transcriptional abundance. In adults, the system exhibited broad tissue distribution, with higher expression in brain and retina, as well as sex-dependent differences in peripheral tissues. In the hyperglycemia model, exogenous TRH administration induced a hypoglycemic effect in males and modulated gene expression in metabolically active tissues. This effect was not associated with a direct increase in insulin transcription, but rather with a transcriptional modulation aimed at preserving tissue functional integrity under metabolic stress.

Collectively, these findings position the TRHergic system as a functional, tissue-specific, and sex-dependent peripheral modulator of glycemic homeostasis, with potential therapeutic relevance in T2DM.

1. Introducción

El metabolismo de la glucosa constituye un proceso fisiológico fundamental para el mantenimiento de la homeostasis energética en los vertebrados (Chen et al., 2019). Esta regulación depende de una compleja red de señales hormonales y moleculares que coordinan la captación, la utilización y el almacenamiento de la glucosa en tejidos periféricos como el hígado, el músculo y el tejido adiposo (Park et al., 2021). Dentro de este sistema, las hormonas pancreáticas clásicas, particularmente la insulina y el glucagón, desempeñan un papel central; sin embargo, su acción se encuentra finamente modulada por otras hormonas que influyen tanto en la secreción hormonal como en la sensibilidad tisular a la glucosa (Tokarz et al., 2018).

En este sentido, la hormona liberadora de tirotropina (TRH) podría figurar como un modulador energético. La TRH ha sido históricamente estudiada como un componente clave del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), donde regula la secreción de la tirotropina (TSH) y, de manera indirecta, la producción de hormonas tiroideas (Lazcano et al., 2025). No obstante, en las últimas décadas ha emergido evidencia sobre el espectro funcional de la TRH, revelando su participación en la regulación del metabolismo energético y, en particular, en el control de la homeostasis glicémica (Vargas et al., 2024).

Diversos estudios han demostrado que la TRH no limita sus funciones endocrinas centrales al sistema nervioso central (SNC), sino que también actúa a nivel periférico (Luo & Yano, 2004; Yano & Luo, 2004). En las células β del páncreas, se ha observado su co-localización con la insulina, lo que sugiere una interacción funcional directa entre ambos sistemas (Basmaciogullari et al., 2000). Por otro lado, la TRH ha mostrado capacidad para estimular la secreción de la insulina tanto en condiciones basales como en respuesta a incrementos en los niveles de la glucosa, así como para reestablecer estados de hiperglicemia inducida mediante mecanismos que regulan tanto al SNC como al páncreas (Amir, 1988; Luo et al., 2008; Yamada et al., 1997). Estos hallazgos posicionan a la TRH como un aparente modulador de la función pancreática y del metabolismo glicémico.

De forma complementaria, la administración exógena de la TRH ha demostrado restaurar la secreción de la insulina en modelos murinos con alteraciones en la biosíntesis o actividad endógena de este neuropéptido, sugiriendo que la TRH es necesaria para una respuesta pancreática adecuada (Najvirtová et al., 2005). Asimismo, el receptor de la TRH (TRH-R) ha sido identificado en el páncreas de roedores y otros vertebrados, donde su activación desencadena cascadas de señalización intracelular similares a las observadas en el tejido hipofisario (Mulla et al., 2009; Yamada et al., 2000). La presencia funcional de este receptor en tejido pancreático respalda la hipótesis de que la TRH podría ejercer efectos autocrinos

y/o paracrinós, modulando directamente la actividad de las células β del páncreas y contribuyendo al control metabólico periférico.

En este contexto, el pez cebra se ha consolidado como un modelo experimental altamente relevante para el estudio del metabolismo basal y las enfermedades que lo pueden alterar, debido a la elevada conservación evolutiva de algunas de sus vías fisiológicas con respecto a los mamíferos (Zang et al., 2018). Este organismo posee un sistema pancreático funcional y expresa genes clave para la regulación glicémica, incluyendo a la insulina, receptores de insulina (INS-R) y transportadores de la glucosa (slc2a) (Dos Santos et al., 2020; Nipu et al., 2022). Sin embargo, hasta el momento, la presencia y la caracterización del sistema TRHérgico en el pez cebra (TRH, isoformas de su receptor y la enzima que degrada a la TRH (TRH-DE)) aún no se ha explorado y analizado de forma integrada sobre las funciones del metabolismo glicémico.

Finalmente, el estudio de la expresión y función del sistema TRHérgico en el pez cebra podría aportar información novedosa sobre la interacción molecular entre la TRH y la insulina, así como sobre su posible papel en la modulación del metabolismo glicémico. Comprender estas interacciones no solo contribuiría al conocimiento básico de la fisiología endocrina comparada, sino que también podría abrir nuevas perspectivas para inspirar el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al tratamiento de trastornos metabólicos, como la diabetes mellitus.

2. Antecedentes Generales

2.1 La Diabetes Mellitus tipo 2: panorama epidemiológico

La Diabetes Mellitus (DM) constituye un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas principalmente por la presencia de hiperglicemia crónica, resultado de los defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina, lo que conlleva a presentar alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas (Lovic et al., 2020). La DM presenta una etiología multifactorial en la que intervienen factores genéticos y epigenéticos, así como factores ambientales y de estilo de vida (Dhawan et al., 2019).

De acuerdo con la Asociación Americana para la Diabetes (ADA, 2025), la DM se clasifica en cuatro categorías principales: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), causada por destrucción autoinmune de las células β pancreáticas y deficiencia absoluta de la insulina; diabetes mellitus tipo 2 (DM2), caracterizada por presentar resistencia a la insulina acompañada de un déficit progresivo en su secreción; diabetes mellitus gestacional (DMG), diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo; y otros tipos específicos de diabetes, como la monogénica o la diabetes secundaria a

enfermedades pancreáticas y uso de fármacos. Entre ellas, la DM2 representa entre el 90-95% de los casos en todo el mundo, lo que la convierte en el tipo más prevalente y en un problema prioritario de salud pública (IDF, 2021).

A nivel mundial, la DM2 ha alcanzado proporciones epidémicas. En 2024 se estimó que 589 millones de adultos entre 20 y 79 años vivían con diabetes, y las proyecciones indican que esta cifra podría ascender a 853 millones para 2050, es decir, uno de cada ocho adultos. Además, se calcula que alrededor del 43% de los casos permanecen sin diagnosticar, lo que incrementa el riesgo de complicaciones y muerte prematura. En consecuencia, la diabetes es responsable de aproximadamente 3.4 millones de muertes al año, lo que equivale a una muerte cada nueve segundos (IDF, 2021). En México, el panorama es igualmente preocupante. De acuerdo con la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) de 2018 y 2020, la prevalencia de DM2 fue de 16.8% y 15.7%, respectivamente, lo que equivale a casi 13 millones de adultos afectados. Un aspecto crítico es que entre el 29% y el 38% de los encuestados desconocían su condición. Además, menos de la mitad de los pacientes con diagnóstico previo lograron alcanzar un control glicémico adecuado ($HbA1c < 7\%$), situación que se mantuvo constante en ambas encuestas (Basto-Abreu et al., 2021).

Es importante señalar los criterios actuales de diagnóstico de la DM2, establecidos por la ADA, se han mantenido constantes en los últimos años y se aplican de manera rutinaria en la práctica clínica en México (Secretaría de Salud [SSA], 2010; ADA, 2025). Estos criterios incluyen: glucosa plasmática en ayuno (GPA) ≥ 126 mg/dL, glucosa plasmática a las dos horas (GP2h) ≥ 200 mg/dL tras una sobrecarga oral de 75 g. de glucosa, hemoglobina glicada ($HbA1c$) $\geq 6.5\%$, o glucosa plasmática casual (GPC) ≥ 200 mg/dL en presencia de síntomas clásicos de hiperglicemia. Cabe señalar que, en ausencia de una crisis hiperglicémica, el diagnóstico debe confirmarse con dos resultados alterados en pruebas separadas (SSA, 2010; ADA, 2025).

La DM2 rara vez se presenta de forma aislada, suele coexistir con múltiples comorbilidades que aumentan el riesgo de discapacidad y mortalidad (IDF, 2021). A nivel global, se estima que alrededor del 70% de los pacientes presentan sobrepeso u obesidad, más del 50% hipertensión arterial y cerca del 60% dislipidemia. Estas condiciones favorecen el desarrollo de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía, neuropatía) y macrovasculares (infarto agudo de miocardio, enfermedad cerebrovascular, enfermedad arterial periférica (Darenskaya et al., 2021). En México, se confirma esta tendencia (Rojas-Martínez et al., 2024; Reyes-García et al., 2019); como ejemplo, el estudio de Basto-Abreu et al. (2021) realizado en el ámbito de Medicina Familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó que el 52.9% de los pacientes con DM2 tenían

obesidad, 52.2% hipertensión y 51.4% dislipidemia, mientras que la prevalencia de neuropatía fue de 18.8%, nefropatía 3.6% y retinopatía 2.9%, lo que resalta la coexistencia de complicaciones antes mencionadas en la población mexicana. Cabe destacar que en México la distribución de la diabetes no es homogénea y que sus manifestaciones clínicas y epidemiológicas dependen de factores tanto biológicos como sociales (Antonio-Villa et al., 2024).

De igual manera, es fundamental resaltar las diferencias por sexo, un aspecto emergente en la investigación sobre la DM2. La evidencia actual muestra que hombres y mujeres presentan particularidades en la epidemiología, en las comorbilidades asociadas, en los criterios de diagnóstico y otros aspectos clínicos y terapéuticos de la enfermedad (López Simarro & Pérez Unanua, 2024). Estas diferencias se resumen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Diferencias entre hombres y mujeres en la epidemiología, comorbilidades, evolución clínica y tratamiento de la DM2

Categoría	Mujeres	Hombres
Epidemiología y diagnóstico	Prevalencia menor en edades medias y mayor en edades avanzadas. Suelen presentar intolerancia a glucosa posprandial asociada a resistencia periférica.	Mayor frecuencia de hiperglicemia en ayunas.
Comorbilidades	Mayor frecuencia de obesidad, hipertensión, enfermedad renal crónica, neuropatía e infecciones urinarias.	Predominan las enfermedades cardiovasculares.
Etapas de la vida	Infancia/adolescencia: mayor riesgo de complicaciones en pubertad. Edad fértil: 25% presenta SOP, lo que provoca mayor riesgo de CV, DMG y DM2 futura. Embarazo: 12% DMG, lo que provoca mayor riesgo de aborto, preeclampsia y complicaciones neonatales. Perimenopausia: 10.9% DM2 Ancianas: 41% DM2, lo que provoca mayor riesgo de demencia, depresión y fracturas.	Infancia/adolescencia: menos riesgo de complicaciones puberales. Andropausia: 23.8% DM2. Ancianos: menor riesgo de demencia, depresión y fracturas que mujeres.
Complicaciones	Cardiovasculares: menor control de PA, lípidos e inflamación. Mayor riesgo relativo de complicaciones CV; principal causa de muerte. Renales: mayor deterioro de filtrado glomerular y progresión a enfermedad renal terminal. Neuropatía autonómica más frecuente en mujeres	Cardiovasculares: alta prevalencia, pero menor riesgo relativo comparado con mujeres. Renales: mayor presencia de albuminuria. Neuropatía periférica más común en hombres

Tratamiento y efectos adversos	Metformina: mayor reducción de glicemia y peso, pero más efectos a nivel del tracto GI. Glitazonas: mayor riesgo de fracturas y edemas. iSGLT2: mayor causa de infecciones urinarias y cetoacidosis. arGLP1: mayor pérdida de peso, más efectos en el tracto GI. Insulina: más usada; peor control HbA1c y más hipoglicemias en mujeres delgadas. Cirugía bariátrica: más frecuente (80%).	Sulfonilureas: mayor reducción de HbA1c. Glitazonas: mayor riesgo de cáncer de vejiga. iSGLT2: menos efectos adversos que en mujeres. Insulina: menor uso comparado con mujeres. Cirugía bariátrica: menos frecuente.
---------------------------------------	---	--

Nota: CV: cardiovascular; SOP: síndrome de ovario poliquístico; DM2: diabetes mellitus tipo 2; DMG: diabetes gestacional; PA: presión arterial; GI: gastrointestinal; iSGLT2: inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2; arGLP1: agonistas del receptor de GLP-1; HbA1c: hemoglobina glicada.

2.2 Papel fisiológico de la insulina

La insulina es una hormona peptídica compuesta por 51 aminoácidos y es secretada por las células β del páncreas (González-Mujica, 2017). Es la hormona reguladora central del metabolismo energético y la principal anabólica del organismo, ya que promueve el almacenamiento del glucógeno y de los triglicéridos al tiempo que inhibe procesos catabólicos como la glucogenólisis y la lipólisis (Norton et al., 2022). Además de su papel metabólico, ejerce funciones pleiotrópicas que incluyen la regulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos, como GLUT4 (SLC2A4), glucocinasa (GCK), glucógeno sintasa (GYS), acetil-CoA carboxilasa (ACACA) y la sintasa de ácidos grasos (SAG), entre otros. Asimismo, esta hormona estimula procesos de proliferación y diferenciación celular en diversos tipos celulares, incluyendo hepatocitos, miocitos esqueléticos, adipocitos y células β pancreáticas, principalmente a través de las vías de señalización PI3K/AKT y MAPK, las cuales se describen con mayor detalle más adelante en esta sección y participan en la regulación de procesos de crecimiento, supervivencia celular y metabolismo. Adicionalmente, la insulina inhibe la secreción de glucagón por las células α pancreáticas y participa en la modulación del apetito a nivel del SNC (Tokarz et al., 2018).

La insulina deriva de un precursor proteico denominado pre-proinsulina (pre-proINS) de 110 aminoácidos. Tras la eliminación del péptido señal en el retículo endoplásmico (RE), se forma la proinsulina, la cual se pliega y se estabiliza por enlaces disulfuros entre residuos de cisteína. Posteriormente, en el aparato de Golgi (AG), la proinsulina es procesada por las prohormonas convertasas PC1/3 y PC2 y la carboxipeptidasa E, que escinden la molécula para generar a la insulina madura (**Figura 1**) y al péptido C en cantidades equimolares.

Finalmente, la insulina plegada se almacena en gránulos secretores formando hexámeros estabilizados por iones de Zn^{2+} , constituyendo un reservorio de insulina madura lista para ser secretada ante la demanda metabólica (González-Mujica, 2017).

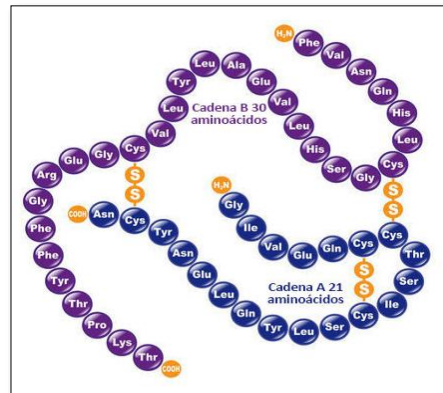


Figura 1. Estructura de la insulina madura. Se muestran las cadenas A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos) unidas mediante tres puentes disulfuro, los cuales estabilizan la conformación biológicamente activa de la hormona. Adaptado de González-Mujica, 2017.

En este contexto, las células β liberan a la insulina principalmente en condiciones posprandiales, cuando el incremento de la glucosa intracelular (5 mM) eleva la relación ATP/ADP, esto resulta en el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP (K^+ ATP) condicionando la despolarización de la membrana plasmática de la célula β y a su vez, la apertura de canales de calcio (Ca^{2+}). Esto desencadena la exocitosis de los gránulos de insulina, en una primera y rápida fase de secreción. De forma complementaria, las incretinas intestinales, el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y el péptido inhibidor gástrico (GIP), actúan sobre receptores acoplados a proteína G (GPCR40) sobre la célula β e incrementan los niveles intracelulares de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y activan vías de señalización mediadas por la proteína cinasa A (PKA) y la proteína intercambiadora activada por AMPc 2 (Epac2), lo que potencia la síntesis y la liberación sostenida de la insulina y contribuye a restaurar el reservorio de la hormona (Boland et al., 2017; González-Mujica, 2017). Una vez liberada, la insulina alcanza la circulación portal, donde el hígado depura cerca del 60%, el riñón metaboliza entre 30 y 35% y el resto se elimina en el músculo y en tejido adiposo. La vida media plasmática de la insulina es menor a diez minutos (González-Ortiz et al., 2001).

La insulina ejerce su acción a través de su receptor (receptor de insulina; IR), una glucoproteína transmembranal con actividad tirosina cinasa formada por un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$. Las subunidades α se localizan extracelularmente y son altamente glucosiladas, además, contienen los sitios de unión a la hormona, y las subunidades β atraviesan la membrana plasmática y poseen un dominio citoplasmático con la actividad tirosina cinasa (Lawrence, 2021). La unión de la insulina al dominio extracelular induce cambios conformacionales que promueven la autofosforilación de los residuos de tirosina, lo que activa cascadas de señalización intracelular mediadas principalmente por la vía de la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K) y la vía de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAPK) (Mendívil Anaya & Sierra Ariza, 2005). Tras ejercer su función, el complejo insulina–receptor es internalizado y degradado en endosomas o por la enzima degradadora de la insulina, mientras que los receptores son reciclados a la superficie celular (Boland et al., 2017).

A nivel molecular, tras la activación del IR, este fosforila proteínas adaptadoras intracelulares como los sustratos del receptor de insulina (IRS). Entre ellos, IRS-1 e IRS-2 son los más ampliamente expresados y presentan funciones parcialmente diferenciadas: IRS-1 se asocia principalmente con efectos tróficos y de crecimiento celular, mientras que IRS-2 participa de manera más prominente en la regulación de procesos metabólicos (Boland et al., 2017). Otro sustrato relevante es Shc, el cual, en asociación con Grb2, activa la cascada de señalización Ras/Raf/MEK/MAPK. Esta vía se encuentra estrechamente vinculada con procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular, ya que conduce a la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes asociados al ciclo celular y a la respuesta a factores de crecimiento, tales como c-FOS, c-JUN, c-MYC y Cyclin D1 (CCND1) (Guo et al., 2020). A partir de estos sustratos se derivan tres rutas de señalización canónicas:

1.- PI3K–Akt/PKB, la cual es responsable de la mayoría de los efectos metabólicos de la insulina, incluyendo la translocación de la isoforma 4 del transportador de glucosa (GLUT4) hacia la membrana plasmática, así como la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas.

2.- Ras/MAPK, vinculada con la proliferación celular, la diferenciación y la regulación génica mediada por la insulina.

3.- CAP/APS–PKC, una ruta alterna para el transporte de GLUT4.

(González-Mujica, 2017; Mendívil Anaya & Sierra Ariza, 2005)

A partir de estas vías de señalización, particularmente la ruta PI3K–Akt/PKB, la insulina ejerce uno de sus efectos metabólicos más relevantes: la regulación del transporte de glucosa hacia el interior celular. Este proceso depende de una familia específica de transportadores conocidos como transportadores facilitadores de glucosa (GLUTs) (Tokarz et al., 2018). Los GLUTs pertenecen a la familia de proteínas facilitadoras codificadas por los genes *slc2a* y constituyen el principal mecanismo de transporte pasivo de glucosa a través de la membrana plasmática. Hasta la fecha se han identificado al menos 14 isoformas (GLUT1–GLUT14), las cuales presentan distribución tisular específica y diferentes afinidades por la glucosa (Holman, 2018).

GLUT1 se expresa de manera ubicua y es responsable del transporte basal de glucosa, particularmente en tejidos con alta demanda energética constante como el cerebro y los eritrocitos. GLUT2, presente en hígado, riñón y células β pancreáticas, posee baja afinidad, pero alta capacidad de transporte, lo que le permite actuar como sensor de glucosa en estados posprandiales. GLUT3, altamente expresado en neuronas, presenta elevada afinidad por la glucosa, asegurando el suministro energético cerebral incluso en condiciones de baja glicemia. De particular relevancia metabólica es GLUT4, el principal transportador insulino-dependiente, localizado en músculo esquelético y tejido adiposo. Su translocación desde compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática es regulada por la activación de la vía PI3K/Akt tras la unión de la insulina a su receptor, constituyendo un mecanismo clave para la captación posprandial de glucosa (Navale & Paranjape, 2016). La adecuada expresión y regulación funcional de estos transportadores es esencial para mantener la homeostasis glicémica.

En este contexto, el principal estímulo para la síntesis y secreción de la insulina es el incremento de glucosa intracelular, sin embargo, su expresión está estrictamente regulada por elementos *cis* en la región promotora del gen y por factores de transcripción que la reconocen para promover la expresión génica (Yang et al., 2023). En humanos, esta región promotora se extiende aproximadamente 400 pb antes del sitio de transcripción y contiene varios elementos conservados: el elemento A, reconocido por PDX-1, un factor esencial para el desarrollo pancreático y la regulación del gen de la insulina; el elemento E, que incluye motivos E-box a los cuales se une NeuroD1/BETA2 de la familia bHLH; el elemento C, sitio de unión de MafA, un factor exclusivo de las células β pancreáticas maduras e indispensable para la activación dependiente de glucosa del gen; el elemento Z, asociado a factores tipo zinc-finger como Zfp206; y el elemento CRE (elemento de respuesta a AMPc), sensible a la señalización mediada por AMPc/PKA, que integra estímulos metabólicos y hormonales. La interacción coordinada de estos elementos asegura que la transcripción de la insulina sea específica de las células β y responda

dinámicamente al estado energético del organismo (Melloul, Marshak & Cerasi, 2002).

Finalmente, existen otros moduladores que contribuyen a la regulación de la actividad biológica de la insulina, entre ellos, aminoácidos como la arginina, leucina y glutamina, ácidos grasos, y hormonas como la prolactina, que estimula la función de los islotes pancreáticos durante el embarazo, o el cortisol y la epinefrina, que actúan como inhibidores de la secreción de la insulina. Por otro lado, la oxitocina y la acetilcolina la estimulan, al igual que las incretinas, que potencian la secreción posprandial y aseguran su acción en la homeostasis glicémica (Newsholme & Krause, 2012). De manera adicional, otros péptidos neuroendocrinos, como la hormona liberadora de tirotropina (TRH), han sido propuestos como posibles moduladores de la secreción de insulina y del metabolismo de la glucosa, aspecto que será abordado con mayor detalle en secciones posteriores.

No obstante, cuando el papel fisiológico de la insulina se ve comprometido y se altera el equilibrio energético, contribuye de manera directa al desarrollo y progresión de la DM2 (DeFronzo, 2004).

2.3 Fisiopatología de la DM2

La DM2 es una enfermedad compleja cuyo desarrollo se basa en la interacción de dos procesos fisiopatológicos fundamentales: la resistencia a la insulina (RI) en tejidos periféricos, particularmente en el músculo esquelético, el hígado, el tejido adiposo, así como la disfunción progresiva de las células β del páncreas (Ojo et al., 2023). La historia natural de la enfermedad es insidiosa y silenciosa, pudiendo extenderse durante años sin manifestaciones clínicas evidentes. En los inicios de la enfermedad, el músculo esquelético disminuye la captación de glucosa posprandial (después de la comida), mientras que el hígado incrementa la producción endógena de glucosa a través de la gluconeogénesis. Sin embargo, a pesar de la presencia de estas alteraciones metabólicas, los niveles de la GPA pueden mantenerse dentro de los rangos normales (80-100 mg/dl) debido a una hipersecreción compensatoria de la insulina por parte de las células β del páncreas. Este mecanismo adaptativo es transitorio, y con el tiempo, su capacidad secretora puede verse superada por el desgaste metabólico (Malone & Hansen, 2019; Skyler et al., 2017).

Cuando la función pancreática se altera, emerge la intolerancia a la glucosa, clínicamente reconocida como un estado de prediabetes (Carrera Boada & Martínez-Moreno, 2013). En esta etapa, la insulina secretada resulta insuficiente para contrarrestar el grado de resistencia, lo que se traduce en hiperglicemia posprandial sostenida (niveles de GPA: 100-126 mg/dl). Algunos pacientes pueden presentar síntomas inespecíficos como fatiga, somnolencia o aumento de peso,

aunque la mayoría permanece asintomática. Es importante mencionar que en este punto la condición aún es reversible mediante modificaciones en el estilo de vida (Banday, Sameer & Nissar, 2020). Si las alteraciones metabólicas persisten, la disfunción de las células β progresa y se establece la diabetes clínica (DM2), la cual esta caracterizada principalmente por la elevación de la GPA (≥ 126 mg/dl). Entonces se presentan las manifestaciones clásicas descritas en la práctica clínica: poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso no intencionada y visión borrosa (Banday et al., 2020). La evidencia clínica ha demostrado que la RI puede preceder al diagnóstico de la enfermedad por más de una década y que, incluso en la etapa de prediabetes, la pérdida de masa y función de las células β puede alcanzar el 40–50%, incrementándose hasta un 80–85% en la DM2 (Christensen & Gannon, 2019).

Diversos mecanismos se han asociado a la progresión de la enfermedad (Singh, Shadangi, Gupta & Rana, 2025). La glucotoxicidad y la lipotoxicidad que son derivadas de la exposición crónica a la hiperglicemia y a los ácidos grasos libres (AGLs) deterioran la función de las células β y promueven la RI. Adicionalmente, la acumulación del polipéptido amiloide (IAPP) en los islotes pancreáticos ejerce un efecto citotóxico que promueve apoptosis, mientras que los defectos en la señalización de las incretinas reducen la capacidad insulínica posprandial (DeFronzo, 2004). Un factor central es la obesidad visceral, que funciona como detonante y acelerador del proceso fisiopatológico (Skyler et al., 2017). El tejido adiposo en exceso adquiere un papel endocrino activo al liberar adipocinas proinflamatorias como la leptina y la resistina, citocinas como el TNF- α , IL-6 e IL-1 β , además de AGLs que interfieren con la señalización de la insulina en el hígado y el músculo. Este entorno metabólico genera un estado de inflamación crónica de bajo grado que sostiene la hiperglicemia, además, acelera el deterioro pancreático y favorece las complicaciones vasculares (DeFronzo, 2004; Lee, Park & Choi, 2022). A continuación, resulta importante detallar algunas alteraciones fisiopatológicas de la DM2 en los principales tejidos insulino-sensibles:

En el hígado, en condiciones fisiológicas, la insulina inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis estimulando la síntesis de glucógeno. Sin embargo, bajo la condición de RI, la vía PI3K/Akt se encuentra alterada ya que existen defectos en los procesos de fosforilación de los residuos de serina y treonina del receptor de insulina. Como resultado factores de transcripción regulados negativamente por la insulina, como FOXO1 permanecen activos lo cual promueve la expresión de genes gluconeogénicos como el fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), lo que conduce a una sobreproducción de glucosa durante el ayuno. Curiosamente, la vía lipogénica mediada por SREBP-1c conserva parte de su actividad, lo que favorece la lipogénesis de *novo* y la acumulación de triglicéridos hepáticos, condición que propicia la esteatosis (Singh et al., 2025).

En el tejido adiposo, la insulina pierde su efecto antilipolítico. Normalmente, la hormona suprime la acción de la lipasa sensible a hormonas (LSH), evitando la liberación excesiva de AGLs. Sin embargo, bajo RI, los adipocitos liberan cantidades elevadas de AGLs y glicerol, que son captados por el hígado y el músculo, generando un entorno de lipotoxicidad que intensifica el cuadro fisiopatológico. Asimismo, el tejido adiposo visceral secreta citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β y MCP-1, también se liberan de adipocinas proinflamatorias como resistina y leptina que reclutan células inmunitarias innatas como los macrófagos que instauran un estado de inflamación crónica de bajo grado. Por otro lado, se reducen los niveles de adiponectina, una adipocina involucrada en la promoción de la sensibilidad a la insulina (Singh et al., 2025).

En el músculo esquelético, se captan hasta el 80% de la glucosa posprandial, la señalización de la insulina se ve particularmente comprometida. El exceso de AGLs circulantes favorece la acumulación intramiocelular de metabolitos lipídicos como el diacilglicerol (DAG) y las ceramidas, que a su vez pueden activar a la proteína cinasa C θ (PKC θ). Esta enzima fosforila residuos de serina en IRS-1, interfiriendo con la vía PI3K/Akt y limitando la translocación del GLUT4 hacia la membrana plasmática. Como consecuencia, la captación de glucosa disminuye drásticamente, lo que se traduce en hiperglicemia posprandial, una de las primeras alteraciones detectables en la evolución hacia la DM2. Adicionalmente, se ha descrito que en la RI se produce una desregulación de otras rutas críticas de PI3K/Akt, entre ellas la inactivación de mTORC1, lo que provoca disminución de la síntesis proteica. Al mismo tiempo, FOXO1 permanece activo y favorece procesos de proteólisis, mientras que la glucógeno sintasa quinasa (GSK) mantiene inhibida a la enzima glucógeno sintasa (GS), reduciendo así la capacidad del músculo para almacenar glucógeno (Singh et al., 2025).

El páncreas sufre los efectos de la sobrecarga funcional dada por la RI. Las células β se ven obligadas a secretar cantidades crecientes de la insulina, lo que inicialmente mantiene la normoglicemia, pero con el tiempo conduce a un estado de disfunción caracterizado por la pérdida de la masa y la reducción de la capacidad secretora. La glucotoxicidad y lipotoxicidad crónicas incrementan el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplásmico (RE), provocando acumulación de proteínas mal plegadas y la activación de la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), lo que limita la capacidad de reponer el reservorio de la insulina. A esto se suman vías proapoptóticas mediadas por la mitocondria (citocromo c y caspasa 9), receptores de muerte celular como Fas y TNFR1, y mecanismos proinflamatorios como el inflamasoma NLRP3, que en conjunto promueven la apoptosis de las células β . Además, los depósitos de IAPP ejercen un efecto citotóxico adicional. La consecuencia final es la incapacidad de compensar la RI, estableciéndose de

manera definitiva la hiperglicemia sostenida que define a la DM2 (Eizirik, Pasquali & Cnop, 2020; Singh et al., 2025).

2.4 Tratamiento farmacológico de la DM2: terapias convencionales y emergentes

La DM2 constituye una de las enfermedades crónicas con mayor impacto económico y social a nivel global. En 2021, el gasto sanitario asociado a la atención de la diabetes se estimó en 966 mil millones de dólares, cifra que ha mostrado un incremento sostenido y que se proyecta superará el billón de dólares hacia el 2045 (IDF, 2021). Este gasto se relaciona con el mal control glicémico rutinario, con la atención de complicaciones micro y macrovasculares, así como con la pérdida de productividad laboral y el aumento de hospitalizaciones (Bommer et al., 2018). Aunado a esto, la DM2 representa una de las principales causas de muerte prematura y discapacidad global. Se estima que los pacientes con diabetes viven en promedio entre 6 y 9 años menos que la población sin diabetes (Emerging Risk Factors Collaboration, 2011). De acuerdo con el estudio Carga Global de la Enfermedad (GBD) 2019, la diabetes ocupa el noveno lugar como causa de años de vida perdidos y el séptimo lugar como causa de años vividos con discapacidad. Estas cifras subrayan la necesidad de estrategias terapéuticas más efectivas que permitan contener los costos y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

En este contexto, las guías clínicas internacionales (ADA, 2025; Davies et al., 2022) coinciden en que la metformina continúa siendo el pilar de la terapia inicial, salvo contraindicación, como la insuficiencia renal moderada y grave y la presencia de enfermedad hepática avanzada. El mecanismo de acción principal de este fármaco es la reducción de la gluconeogénesis hepática mediante la activación de la vía AMPK, lo que disminuye la producción endógena de glucosa y mejora la sensibilidad periférica (Rena, Hardie & Pearson, 2017). Se ha demostrado, además, que ofrece beneficios cardiovasculares y no genera aumento de peso, lo que la convierte en la terapia estándar. Por otro lado, a la metformina se suman otras clases farmacológicas que conforman la terapia convencional:

Por un lado, las sulfonilureas como la glibenclamida y las meglitinidas como la repaglinida, actúan estimulando la secreción de insulina al unirse al receptor SUR1 de los canales K^+ATP en las células β pancreáticas, promoviendo el cierre de los mismos y la entrada de Ca^{2+} citosólico, lo cual desencadena la exocitosis de la insulina (Proks, Reimann, Green, Gribble & Ashcroft, 2002). Aunque son eficaces en la reducción de los niveles de HbA1c, su uso se ve limitado por el riesgo de hipoglicemia, el aumento de peso y el desgaste fisiológico de la célula β . Asimismo, las tiazolidinedionas, como la pioglitazona, actúan como agonistas de los receptores

nucleares PPAR γ , regulando la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Lebovitz, 2019). Estas mejoran la sensibilidad a la insulina en el hígado, el músculo y el tejido adiposo, pero su perfil de seguridad se ve limitado por efectos adversos como la retención de líquidos, riesgo de insuficiencia cardíaca y aumento de peso (Nesto et al., 2003). Los inhibidores de la enzima dipeptidil-peptidasa 4 (DPP-4), como la sitagliptina y la linagliptina, actúan prolongando la vida media de las incretinas endógenas, potenciando la secreción de la insulina dependiente de glucosa y reduciendo la secreción de glucagón. Aunque su eficacia glicémica es moderada, son bien tolerados y con bajo riesgo de hipoglicemia (Mulvihill & Drucker, 2014). Se utilizan de igual manera a los agonistas de GLP-1 (exenatida, liraglutida, semaglutida), estos imitan la acción de la incretina al unirse a su receptor en células β (GPCR40), aumentando la secreción de la insulina dependiente de glucosa, inhibiendo el glucagón, retrasando el vaciamiento gástrico y reduciendo el apetito. Esta clase de medicamentos han demostrado beneficios robustos en la reducción del peso y en la protección cardiovascular, posicionándolos como una de las terapias más atractivas en la actualidad (Marso et al., 2016). Los inhibidores de SGLT2 (dapagliflozina, empagliflozina, canagliflozina) bloquean el cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el túbulo proximal renal, aumentando la excreción urinaria de la glucosa. Además de su efecto hipoglicemiante independiente de la insulina, han demostrado beneficios en patologías como la insuficiencia cardíaca y la enfermedad renal crónica. Sin embargo entre los efectos adversos se han descrito el aumento en las infecciones genitourinarias, fracturas óseas y cetoacidosis diabética euglicémica (Wiviott et al., 2019; Zinman et al., 2015). Los inhibidores de α -glucosidasas (acarbose) retrasan la digestión de carbohidratos en el intestino delgado, disminuyendo la glicemia posprandial, aunque su uso es limitado por efectos gastrointestinales (Chiasson et al., 2002). Finalmente, la insulina exógena se reserva para etapas avanzadas o cuando el control glicémico no se logra con fármacos orales e inyectables, siendo indispensable en presencia de descompensaciones metabólicas (Rena et al., 2017).

A pesar de estas opciones, muchas presentan pérdida de eficacia con el tiempo, efectos adversos o limitaciones en su uso, lo que ha impulsado la investigación en terapias emergentes. Entre estas destacan los agonistas duales GLP-1/GIP, como tirzepatida, que han demostrado reducciones superiores en la HbA1c y el peso corporal respecto a agonistas de GLP-1 tradicionales (Frías et al., 2021). Los triagonistas GLP-1/GIP/glucagón (como retatrutida en desarrollo) buscan potenciar aún más la pérdida de peso al incrementar el gasto energético y modular el metabolismo lipídico (Frías et al., 2021).

Otros blancos emergentes incluyen los análogos de FGF21 y FGF19, que mejoran la sensibilidad a la insulina y reducen la acumulación hepática de triglicéridos, los

activadores de AMPK, que restauran la homeostasis energética a nivel celular, y los inhibidores del inflammasoma NLRP3 o anticuerpos contra IL-1 β , que buscan modular la inflamación crónica de bajo grado característica de la DM2 (Tezze, Romanello & Sandri, 2019).

En paralelo, la investigación continúa explorando los reguladores de PPAR γ , con el objetivo de obtener moduladores selectivos que conserven los efectos sensibilizadores de la insulina, pero minimicen los efectos adversos (Ferguson & Finck, 2021). El éxito observado con las incretinas ha impulsado el interés en moléculas endógenas que poseen efectos metabólicos pleiotrópicos con la intención de perfilar la terapia de la DM2 (Ferguson & Finck, 2021; Frias et al., 2021). En la actualidad, el abordaje terapéutico ha evolucionado de un modelo exclusivamente glicocéntrico hacia un enfoque multidimensional, que no solo prioriza el control glicémico, sino también la reducción del riesgo cardiovascular y renal, la pérdida ponderal, la modulación de la inflamación sistémica y la exploración de nuevas moléculas endógenas con potencial terapéutico (Davies et al., 2022).

2.5 La hormona liberadora de tirotropina (TRH) y sus elementos de señalización: el sistema TRHérgico

La hormona liberadora de tirotropina (TRH; pGlu-Hys-ProNH₂) fue el primer factor hipofisiotrófico aislado (Boler et al., 1969; Burgus et al., 1969) y se encuentra ampliamente distribuida en el SNC (Fröhlich & Wahl, 2019; Lechan & Fekete, 2006). Desde el punto de vista neuroendocrino, se sintetiza en neuronas parvocelulares mediales y periventriculares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Lechan & Fekete, 2006). En mamíferos, su función clásica es la de estimular el eje hipotálamo–hipófisis–tiroides (HHT) (**Figura 2**), efecto mediado por la interacción con su receptor, el receptor de TRH (TRH-R) en células tirotrópicas y lactotrópicas de la adenohipófisis (Joseph-Bravo et al., 2015). Sin embargo, más allá de esta función clásica, se ha demostrado el efecto pleiotrópico de la hormona ejerciendo efectos neuromoduladores, así como efectos ergotrópicos, analépticos y termorreguladores independientes al eje tiroideo (Fröhlich & Wahl, 2019; Vargas et al., 2024).

En este sentido la distribución de la TRH no se limita al cerebro. Se ha identificado la presencia de este neuropéptido en tejidos periféricos como el corazón, los testículos, el tracto gastrointestinal, las gónadas, linfocitos b y el páncreas (Bačova et al., 2006; Fröhlich & Wahl, 2019; Morley et al., 1977; Štrbák, 2018). Esta localización fuera del SNC permite considerar funciones reguladoras en otros aspectos fisiológicos que incluye funciones metabólicas y reguladoras del balance energético (Alvarez-Salas et al., 2022). Incluso se ha propuesto su utilidad

terapéutica en condiciones como el traumatismo medular y enfermedades neurodegenerativas, entre ellas el Alzheimer (Colson & Gershengorn, 2006). Por otro lado se ha descrito la capacidad de la TRH de estimular la secreción de vasopresina (Ciosek & Guzek, 1992) y en algunas especies no mamíferas se ha vinculado con la liberación de la hormona del crecimiento (GH) y de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) (Lazcano et al., 2021).

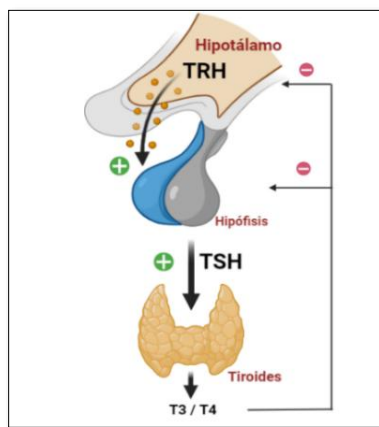


Figura 2. Eje hipotálamo-Hipófisis-Tiroides. Esquema representativo del efecto endocrino de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) sobre el eje tiroideo, así como del mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por las hormonas tiroideas. Elaborado con BioRender.com.

La biosíntesis de la TRH parte de un precursor polipeptídico denominado pre pro-TRH (ppTRH), que en humanos está formado por 242 aminoácidos y que incluye múltiples copias de la secuencia pro-TRH (Glu-His-Pro-Gly) (**Figura 3**). Tras su procesamiento en el RE y en el AG, la prohormona es escindida por la participación de las hormonas convertasas PC1/3, PC2 y de la enzima carboxipeptidasa E, adicionalmente se incluye la ciclación del residuo de glutamina a ácido piroglutámico catalizada por la peptidil- α -amidante monooxigenasa (α -PAM), y la amidación terminal de la molécula en el residuo de prolina (Joseph-Bravo et al., 2016).

Tras la biosíntesis y su empaquetamiento en vesículas secretoras que se posicionan sobre los botones sinápticos de las neuronas TRHergicas, su liberación se ve influenciada por diversos factores químicos y físicos que coordinan el proceso exocítico (Joseph-Bravo et al., 2016; Nillni, 2010). A nivel químico, se ha descrito que la despolarización de la membrana presináptica permite la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes, lo que promueve el aumento del calcio intracelular.

A su vez, el ion induce la movilización de las vesículas que contienen a la TRH hacia el espacio extracelular. De forma paralela, la activación de segundos mensajeros como el AMPc y la PkA, así como la vía del inositol trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG) que activa a la PkC, potencian la secreción de la TRH al modular la exocitosis dependiente de proteínas SNARE (Joseph-Bravo et al., 2016). Estos procesos son modulados por neurotransmisores y neuromoduladores como las catecolaminas, serotonina, acetilcolina, leptina, la hormona estimulante de melanocitos alfa (α -MSH), la proteína relacionada con Agutí (AGRP) y el neuropéptido Y (NPY), los cuales regulan la magnitud de la liberación según las demandas metabólicas y neuroendocrinas (Joseph-Bravo et al., 2016; Fekete & Lechan, 2014). Por otro lado, los factores físicos juegan un papel importante en la liberación de la TRH. La exposición al frío activa la liberación de la TRH a fin de regular la termogénesis dependiente del eje HHT, así como cambios en la presión osmótica o arterial, que modulan la actividad neuroendocrina al interactuar con otros sistemas reguladores como la vasopresina (Joseph-Bravo et al., 2016; Lechan & Fekete, 2006; Fekete & Lechan, 2014).



Figura 3. Estructura del gen humano *ppthr*. El gen presenta una región 5' no traducida (UTR) de ocho nucleótidos, seguida de una secuencia que codifica un péptido señal (SP) de aproximadamente 48 aminoácidos. La región codificante incluye seis repeticiones del péptido precursor proTrh, separadas por secuencias de escisión específicas, y termina con una región 3' no traducida (UTR). Tomado y modificado de Wallis, 2010).

El mecanismo de acción de la TRH implica su síntesis y la liberación de las neuronas TRHérgicas hacia el espacio extracelular; a nivel del SCN, se ha descrito que se libera en la eminencia media y se difunde a través de la vena porta-hipofisiaria hasta el sitio de acción en donde interactúa con el TRH-R (Lazcano et al., 2015).

Este receptor es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas Gq (Sun et al., 2009). En humanos se ha identificado un único receptor funcional, mientras que en roedores existen dos isoformas (TRH-R1 y TRH-R2) y en teleósteos hasta tres (Charli et al., 2020; Li et al., 2020; Sun et al., 2009) (**Tabla 2**).

El mecanismo canónico de acción del TRH-R se da a través de su acoplamiento a proteínas Gq, que activan a la fosfolipasa C (PLC) y con ello la generación de IP₃ y DAG. Este proceso promueve la movilización de Ca²⁺ intracelular, la activación de la PkC y la estimulación de las MAPK, vías responsables de los efectos hipofisiotrópicos y de las acciones neuromoduladoras de la TRH sobre neurotransmisores como catecolaminas, serotonina y acetilcolina (Joseph-Bravo et al., 2016; Trubacova et al., 2022). Sin embargo, además de este efecto canónico, se han descrito mecanismos no canónicos que amplían el espectro funcional del TRH-R. Entre ellos destaca el acoplamiento alternativo a proteínas Gi y Gs, con lo que permite la modulación de los niveles de AMPc, así como la activación de β -arrestinas, que no solo participan en la desensibilización y endocitosis del receptor, sino que también inician cascadas de señalización independientes, como la activación de ERK1/2. Por otro lado, la activación del TRH-R puede influir directamente en la actividad de canales iónicos, incluyendo los canales de potasio y de calcio tipo L, modulando la excitabilidad neuronal. De igual forma, se ha observado una comunicación cruzada con otras vías hormonales, como los receptores de hormonas tiroideas y de glucocorticoides, y efectos prolongados en la expresión génica mediados por factores como CREB (Joseph-Bravo et al., 2016; Trubacova et al., 2022).

Con respecto a la regulación de la acción de la TRH, esta se encuentra finamente controlada por mecanismos de retroalimentación que integran múltiples señales endocrinas y neuronales (Joseph-Bravo et al., 2016). A nivel transcripcional, el gen de la TRH cuenta con regiones promotoras sensibles a diversos factores como al CREB fosforilado (CREBp), que tras la activación de la vía del AMPc favorece la transcripción del gen ppTRH. Asimismo, el receptor de hormonas tiroideas β (TR β) actúa como mediador de la retroalimentación negativa ejercida por las hormonas tiroideas en la circulación (Sugrue et al., 2010). Además, factores como STAT5, los cuales son activados por citoquinas y por la GH, se ha implicado en la regulación positiva del gen. Los glucocorticoides también ejercen un papel modulador al unirse a su receptor en el citoplasma y translocarse al núcleo, donde puede interactuar con elementos de respuesta a glucocorticoides en la región promotora del gen ppTRH, modulando la transcripción ante el estrés (Joseph-Bravo et al., 2016; Trubacova et al., 2022).

La vida media de la TRH es de alrededor de 2 a 6 minutos, ya que está sujeta a degradación por múltiples enzimas proteolíticas distribuidas en el cerebro, la hipófisis, el hígado, el riñón y otros tejidos (Fröhlich & Wahl, 2019). Entre ellas destaca la enzima degradadora de la TRH (TRH-DE), también conocida como piroglutamil-peptidasa II (PPII), una ectoenzima anclada a la membrana plasmática, la cual constituye el principal mecanismo de inactivación de la TRH en el SNC, mientras que en plasma y en tejidos periféricos se ha descrito que actúan otras

enzimas, como la tiroliberinasa (la cual es una isoforma de la TRH-DE no anclada a membrana) y la prolil-endorpeptidasa (Charli et al., 2020; Lazcano et al., 2012). La TRH-DE es una metaloproteinasa dependiente de zinc, localizada como ectoenzima en la membrana plasmática, con el dominio catalítico orientado hacia el espacio extracelular. Esta característica le permite actuar de manera rápida y eficaz sobre la TRH lo que permite inactivarla de manera precisa y regular su señalización (Bauer, 1994; Chávez-Gutiérrez et al., 2006).

Desde el punto de vista estructural, la TRH-DE pertenece a la familia de las aminopeptidasas dependientes de metales y presenta motivos altamente conservados característicos de las zinc-metaloproteinasas. Contiene la secuencia HEXXH(X)₁₈E, en la que los residuos de histidina coordinan al ion Zn²⁺ en el sitio catalítico y el residuo de ácido glutámico participa en la activación de una molécula de agua necesaria para la hidrólisis del enlace peptídico. En humanos, se ha descrito que los residuos His-443, His-447 y Glu-464 forman parte crítica de los sitios catalíticos. La proteína presenta además dominios extracelulares que incluyen un dominio rico en glicina y prolina, que le confiere flexibilidad, y regiones transmembranales que permiten su anclaje estable a la membrana celular (Bauer, 1994; Charli et al., 1998; Charli et al., 2020).

Finalmente, se ha descrito la presencia de sitios potenciales de fosforilación en residuos de serina en la cola citoplasmática de la enzima, los cuales podrían participar en la modulación de su tráfico, anclaje y actividad catalítica, aunque aún no se ha confirmado (Lazcano et al., 2021). En cuanto a la actividad enzimática, la TRH-DE presenta una cinética con valores de *km* en el rango de 2-3 µM en humanos y 1-5 µM en roedores, lo cual se considera bajo y refiere a una elevada afinidad por la TRH (Bauer, 1994; Charli et al., 1998; Chávez-Gutiérrez et al., 2006). La hidrólisis es altamente eficiente y específica, generando un dipéptido histidil-prolinamida y un ácido piroglutámico como productos. Esta especificidad está determinada por lo estrecho de su sitio catalítico, que excluye péptidos de mayor longitud y, además, por la preferencia de la enzima por condiciones de pH neutro a ligeramente ácido que condiciona al sitio de acción (Charli et al., 2020).

2.5.1 Análogos de la TRH e inhibidores de la TRH-DE: implicaciones farmacológicas

El estudio farmacológico del sistema TRHérgico ha explorado dos estrategias principales: el desarrollo de análogos estables de la TRH y la inhibición de su degradación enzimática.

Entre los análogos sintéticos destaca la taltirelina (TA-0910), desarrollada en Japón y aprobada para el tratamiento de la ataxia por degeneración espinocerebelosa, que

presenta mayor estabilidad metabólica y biodisponibilidad oral que la TRH nativa (Fukuchi et al., 1998). En paralelo, se han descrito inhibidores específicos de TRH-DE como CPHNA, que actúa de forma reversible sobre el sitio catalítico sin interferir con el receptor de la TRH (Charli et al., 1989). Más recientemente, el compuesto HcPI, aislado de la poliqueta marina *Hermodice carunculata*, ha mostrado inhibición potente y reversible con un Ki de 70.3 nM (Pascual et al., 2023).

Estos compuestos evidencian que la modulación farmacológica del sistema TRHérgico puede incrementar la disponibilidad de la TRH y potenciar sus efectos biológicos.

En conjunto, la TRH, su receptor y la enzima degradadora conforman un sistema TRHérgico integrado, cuya organización asegura la síntesis, liberación, acción y degradación precisa de este tripéptido (Bauer, 1999; Lazcano et al., 2021). El estudio coordinado de estos tres componentes no solo permite comprender los mecanismos de señalización de la TRH en contextos neuroendocrinos y metabólicos, sino que también abre nuevas perspectivas sobre sus implicaciones fisiológicas y patológicas, así como sobre su potencial en el diseño de estrategias farmacológicas.

Tabla 2. Receptores de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH-R): similitudes y diferencias

Receptor	Especies	Patrón de expresión (tejidos)	Afinidad por la TRH	Señalización intracelular	Funciones fisiológicas
TRH-R1	Presente en todos los vertebrados.	La expresión de este receptor es amplia: en mamíferos se encuentra en varias regiones hipotalámicas, la hipófisis anterior y órganos periféricos. En aves, como el pollo, se expresa en hipófisis y testículos. En peces, como el salmón, se localiza en el hipotálamo, pituitaria, retina e intestino grueso.	Presenta una afinidad muy alta por la TRH y sus análogos; en pollo muestra una EC50 alrededor de 0.22 nM para su activación.	Principalmente acoplado a proteínas Gq; la unión de TRH activa la PLC provocando aumento del Ca^{+2} y activa PKC, desencadenando cascadas dependientes de calcio; calmodulina quinasa y MAPK/ERK. También puede acoplarse a Gi y a Gs.	Mamíferos: media los efectos clásicos de la TRH en la hipófisis, estimula la liberación de TSH, PRL y GH. Aves (pollo) TRH - TRH-R1 induce secreción de TSH y especialmente GH. Peces: En teleósteos, TRH no activa la liberación de TSH pero es un fuerte estimulador de GH y PRL en la adenohipófisis, y además promueve la liberación de α -MSH en la pars intermedia.

TRH-R2	Se ha descrito en determinadas especies, incluyendo roedores y en peces como el salmón, pez cebra y se presenta además, en anfibios, como <i>Xenopus laevis</i> .	SNC: expresado principalmente en núcleos hipotalámicos (paraventricular, arcuato, dorso medial y ventro medial) y en regiones límbicas (hipocampo, amígdala, corteza cingulada), con mínima expresión periférica. En salmón, TRHR2a se detecta en el cerebro (telencéfalo e hipotálamo) y existe una variante TRHR2b truncada.	Afinidad equivalente a TRHR1.	Acopla principalmente a proteínas G, activando las mismas cascadas que TRHR1. De hecho, la potencia y el nivel máximo de señal inducida por TRH son similares para TRHR1 y TRHR2. Sin embargo, TRHR2 exhibe actividad constitutiva más alta. En ausencia de ligando muestra mayor activación basal. Además, tras la estimulación con TRH sufre internalización más rápida que TRHR1. Se ha acuñado roles más específicos en el SNC.	Humanos: TRHR2 no está presente. Roedores: TRHR2 no es necesario para el eje tiroideo, pero influye en funciones neurológicas. La eliminación de TRHR2 en ratón provoca alteraciones del comportamiento emocional; las hembras TRHR2 KO -/- muestran mayor conducta depresiva y menor ansiedad comparado con controles. Estos cambios ocurren sin hipotiroidismo. También se ha implicado la señal TRH/TRHR2 central en la modulación de la ingesta y la termogénesis. Aves: TRHR2 no existe. Peces: La función de TRHR2 no está bien definida; dado su patrón cerebral, se especula que podría mediar efectos neuromoduladores de la TRH.
TRHR3	Se ha identificado principalmente en vertebrados no mamíferos, incluyendo: <i>Xenopus laevis</i> , teleosteos como el salmón, pez cebra, tilapia, así como reptiles y aves.	En pollo muestra expresión amplia pero diferencial: niveles muy altos en músculo esquelético, tejido adiposo, testículos, adenohipófisis, médula espinal y numerosas regiones del cerebro (incluyendo el hipotálamo). En salmón, se detecta en el bulbo olfatorio del cerebro y en la retina. En <i>Xenopus</i> , se ha descrito la presencia del mRNA a nivel cerebral.	Afinidad variable según la especie. En <i>Xenopus</i> tiene afinidad significativamente menor por TRH que TRHR1 y 2. En el pollo responde a TRH, éste activa cTRHR3 con EC50 alrededor de 1.2 nM para movilización de Ca ²⁺ (frente a ~0.2 nM en cTRHR1). Estructuralmente, TRHR3 conserva los residuos clave de unión a TRH (Tyr108, Asn112, Tyr277, Arg301 en pollo).	Acoplamiento principalmente vía G. Al activarse por TRH, TRHR3 desencadena las mismas rutas de señalización canónicas de fosfoinosítidos/Ca que TRHR1. Sin embargo, no demostró activar vías no canónicas.	Mamíferos: Este subtipo no existe en humanos ni roedores. Aves (pollo): Tanto TRHR1 como TRHR3 son funcionales y se cree que actúan de forma complementaria mediando los efectos de TRH. Peces: La presencia de TRHR3 en la retina y el sistema olfativo sugiere un papel en funciones neurosensoriales o ritmos neuroendocrinos locales. Anfibios: El rol de TRHR3 no está bien dilucidado.

Nota. La información se integró a partir de estudios comparativos en vertebrados (Galas et al., 2009; Li et al., 2020; Mekuchi et al., 2011; Saito et al., 2003)

3. Antecedentes Particulares

3.1 Distribución filogenética y anatómica del sistema TRHérgico

El sistema TRHérgico constituye un componente evolutivamente conservado a lo largo de los vertebrados, aunque su función presenta variaciones adaptativas según la especie (Lazcano et al., 2021; 2025). En linajes tempranos de vertebrados como las lampreas, se ha descrito la presencia de la TRH en el cerebro de ejemplares juveniles y adultos, lo que sugiere que este neuropéptido ya estaba presente en etapas tempranas de la evolución en vertebrados (Lazcano et al., 2025).

En teleósteos como el salmón, la carpa y el pez cebra, se ha documentado la expresión del ARNm de la TRH en el hipotálamo (Batten et al., 1990; Buckley et al., 2010; Díaz et al., 2002; Hamano et al., 1990). No obstante, a diferencia de lo observado en mamíferos, en estos organismos la TRH no parece ejercer un rol primario en la estimulación de la TSH, siendo la CRH la principal reguladora del eje tiroideo (Bernier et al., 2009; Lazcano et al., 2021). En cambio, la TRH participa en la regulación de la prolactina y la hormona del crecimiento (GH) (De Groef et al., 2006; Sower et al., 2009).

Asimismo, se ha demostrado la presencia de los receptores TRH-R en hipotálamo, hipófisis, retina e intestino en diversas especies de peces (Mekuchi et al., 2011), por otro lado, análisis comparativos *in silico* han identificado ortólogos de estos receptores estructuralmente conservados y con alta homología respecto a mamíferos (Galas et al., 2009; Saito et al., 2003).

En mamíferos, la TRH también se expresa en la médula espinal, tracto gastrointestinal, páncreas, retina, médula adrenal, corazón y sistema inmunitario (Fröhlich & Wahl, 2019). En teleósteos se ha reportado su presencia en intestino, páncreas, corazón y riñón (Blanco, 2020; Bu et al., 2025; Feng et al., 2022), lo que refuerza su carácter multifuncional.

De manera complementaria, la enzima TRH-DE ha sido identificada en tejidos extrahipotalámicos como el hígado, riñón, intestino, placenta, corazón y páncreas, especialmente en roedores, donde su expresión se ha asociado con condiciones metabólicas como el ayuno o alteraciones tiroideas, lo que sugiere un papel en la regulación metabólica sistémica (Fröhlich & Wahl, 2019).

3.2 Ontogenia del sistema TRHérgico durante el desarrollo temprano

En el pez cebra, el desarrollo temprano del sistema TRHérgico ha sido poco explorado; sin embargo, se han descrito aspectos relacionados con la organización inicial de los circuitos neuroendocrinos y el establecimiento del eje HHT (Lazcano et al., 2023). Durante las primeras etapas de la embriogénesis, el SNC experimenta un proceso dinámico de regionalización y diferenciación celular que da origen a poblaciones neuronales especializadas en la regulación endocrina y metabólica. En este contexto, la formación del hipotálamo constituye un evento clave, ya que esta región alberga las neuronas productoras de TRH responsables de la regulación del eje HHT (Lazcano et al., 2023).

La expresión del ARNm de *trh* puede detectarse en el hipotálamo aproximadamente desde las 24 horas post-fertilización (hpf), coincidiendo con las primeras etapas de diferenciación de neuronas neuroendocrinas en el diencéfalo ventral. Durante este

periodo, las neuronas hipotalámicas comienzan a establecer conexiones con la hipófisis en desarrollo, sentando las bases anatómicas y funcionales del sistema neuroendocrino. Entre los 2 y 3 días post-fertilización (dpf) se consolida la organización del eje hipotálamo-hipofisario, con la diferenciación progresiva de los distintos tipos celulares hipofisarios (Lazcano et al., 2023; Lazcano et al., 2025).

Hacia los 5 dpf, el sistema neuroendocrino del pez cebra alcanza un grado significativo de maduración funcional. En esta etapa, las larvas presentan un eje HPT funcionalmente activo, lo que permite la regulación de procesos fisiológicos fundamentales como el metabolismo energético, el crecimiento y la adaptación a las demandas del medio ambiente (Lazcano et al., 2023; Lazcano et al., 2025).

3.3 Rol de la TRH en el páncreas y su implicación en la homeostasis glicémica

La TRH ha sido caracterizada principalmente por su acción sobre el eje HHT; no obstante, como se ha mencionado, también ejerce una amplia variedad de funciones biológicas tanto en el SNC como en tejidos periféricos (Fröhlich & Wahl, 2019; Vargas et al., 2024). Entre estas se incluyen la estimulación de la motilidad intestinal y la secreción gástrica a través de la vía vagal-colinérgica (Goto et al., 2004), la interacción con otros ejes hipofisiotróficos, como el adrenal, en la respuesta al estrés (Choi et al., 2015), así como funciones cognitivas y del sistema nervioso autónomo, donde se le ha asociado con la inducción de la memoria a largo plazo, el incremento de la presión arterial y la estimulación de la actividad respiratoria (Fekete and Lechan, 2014), lo que pone en evidencia sus funciones pleiotrópicas.

La regulación de la TRH está estrechamente vinculada al estado nutricional (Alvarez-Salas et al., 2022; Fekete and Lechan, 2014; Vargas et al., 2024). Se ha descrito que neuropéptidos como la leptina, α -MSH, AGRP y el NPY influyen sobre las neuronas secretoras de la TRH, evidenciando su relación con señales metabólicas asociadas con el balance energético (Fekete and Lechan, 2014; Joseph-Bravo et al., 2015). En este contexto, resulta pertinente considerar la actividad de la insulina, la principal hormona anabólica responsable de la captación de nutrientes y su adecuado metabolismo (DeFronzo, 2004).

La presencia de la TRH en islotes pancreáticos ha sido ampliamente documentada, con evidencia de su participación en la síntesis y secreción de la insulina (Basmaciogullari et al., 2000; Luo & Yano, 2004; Najvirtová et al., 2005; Štrbák, 2018). En un modelo murino deficiente del gen de la TRH, el cual desarrolla hipotiroidismo terciario acompañado de hiperglicemia, se observaron alteraciones en el test de tolerancia oral a la glucosa después de su administración intraperitoneal, dichos efectos fueron atribuibles a una menor capacidad secretora

de la insulina. Asimismo, estudios *in vitro* sobre islotes pancreáticos revelaron que a concentraciones superiores de 10 mM de glucosa, la secreción de insulina era significativamente menor, sugiriendo que la TRH modula la respuesta insulínica frente a cargas elevadas de glucosa. Es importante señalar que la administración de la T4 restauró la función tiroidea en este modelo, pero no corrigió la hiperglicemia, lo que sugiere un efecto de la TRH independiente al eje tiroideo (Yamada et al., 1997). De manera complementaria, Amir (1988) demostró que en ratas hipofisectomizadas tratadas con glucagón para inducir hiperglicemia, la administración de TRH exógena redujo significativamente la concentración de glucosa en sangre.

Diversos estudios en humanos y modelos animales han corroborado la expresión del ARNm de pre proTRH en el páncreas, tanto en etapas fetales como en adultos (Basmaciogullari et al., 2000; Yano & Luo, 2004; Mulla et al., 2009). Experimentos *in vivo* han mostrado que la administración de la TRH (10 µg/kg) revierte la hiperglicemia en ratones tratados con estreptozotocina, efecto asociado a una disminución de la glucosa plasmática y un incremento paralelo de la insulina circulante (Luo et al., 2008). De manera concordante, el tratamiento con 200 nM de la TRH en líneas celulares pancreáticas murinas mostró regular el contenido y la liberación de la insulina (Luo & Yano, 2004). Por otro lado, Najvirtova et al. (2005) reportaron que, en islotes pancreáticos de ratas tratadas *in vivo* con disulfiram, un inhibidor de la biosíntesis de la TRH, presentaban una secreción disminuida de la insulina; asimismo, ensayos *in vitro* mostraron que la exposición a la TRH (1 nM) estimula la liberación de la insulina en condiciones de glucosa elevada (16.7 mM). Además, tratamientos prolongados con la TRH en ratas adultas incrementaron la expresión de genes relacionados con la síntesis y la exocitosis de la insulina, incluyendo receptores acoplados a proteína G, proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺/calmodulina, MAPK3 y MAPK6, GTPasas de la familia Ras y Rab, factores de ribosilación de ADP y n-myc (Yano & Luo, 2004).

Respecto a los receptores, se ha confirmado la expresión de TRH-R en células β pancreáticas de hámster y de ratón (Yamada et al., 2000), así como en islotes pancreáticos fetales humanos (Sun et al., 2009; Mulla et al., 2009). Se ha demostrado que la adición de TRH (1 µM) aumenta la concentración intracelular de Ca²⁺ y la movilización de fosfatidil inositol en células β del páncreas, lo que sugiere una señalización mediada por receptores acoplados a proteínas G de la familia Gq (Mulla et al., 2009). En paralelo, ratones con una depleción del gen para el TRH-R presentan hiperglicemia (Zeng et al., 2007), reforzando el papel esencial de este receptor en la regulación de la glucosa. La evidencia disponible sugiere que la TRH expresada en los islotes del páncreas constituye un modulador clave de la secreción de la insulina y, en consecuencia, del metabolismo de los carbohidratos (Štrbák,

2018). Sin embargo, los mecanismos exactos que median este proceso permanecen en estudio.

Finalmente, resulta importante mencionar que estudios comparativos de la estructura molecular del gen ppTRH de humano comparte un alto grado de identidad con sus ortólogos en roedor, aves, anfibios y teleósteos como el pez cebra, especialmente en las regiones exónicas y en la maquinaria enzimática asociada a la síntesis y metabolismo de la TRH (Bu et al., 2025; Galas et al., 2009; Lazcano et al., 2021; Wallis, 2010). Esta conservación filogenética sugiere que la función de la TRH se ha mantenido a lo largo de la evolución de los vertebrados, apoyando la idea de que su posible función en la regulación pancreática y del metabolismo glucémico también podrían ser considerados dentro de las acciones pleiotrópicas de este tripéptido a lo largo de la evolución.

3.4 El pez cebra como modelo experimental para el estudio del sistema TRHérgico y su papel en la regulación de la homeostasis glicémica

El pez cebra es un teleósteo de agua dulce, perteneciente a la familia *Cyprinidae*, es originario de ríos del sur de Asia, particularmente en India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistán (Spence et al., 2008). Su popularidad como organismo de laboratorio se debe a su amplia distribución, su facilidad de adquisición, su bajo costo de mantenimiento y el hecho de no ser una especie protegida (Lawrence, 2007). Además, comparte importantes similitudes fisiológicas, anatómicas y genéticas con los mamíferos, incluido el ser humano, lo que lo convierte en un modelo robusto para la investigación traslacional en biomedicina (Lin et al., 2016; Zang et al., 2018). Finalmente, este modelo se ha consolidado como un modelo experimental de gran relevancia en la investigación biomédica, siendo utilizado para el estudio de procesos que abarcan desde un nivel celular hasta el organismo completo, tanto en etapas embrionarias como en adultas (Kline et al., 2019).

Entre sus ventajas más destacables se encuentra su rápido desarrollo temprano. A las 24 hpf ya es posible identificar la polaridad antero-posterior y la mayoría de los órganos principales, como el cerebro, el corazón, los ojos y el intestino. A las 72 hpf los embriones eclosionan, y hacia los 5 dpf la mayor parte de los sistemas sensoriales se encuentran funcionalmente maduros (Lawrence, 2007). También su elevada capacidad reproductiva (una sola hembra puede desovar entre 50 y 300 huevos por ciclo sin restricciones estacionales), junto con su reducido tamaño, permiten mantener grandes colonias en condiciones controladas, reduciendo costos y facilitando estudios de gran escala (Lin et al., 2016; Lawrence, 2007). La fecundación externa y la transparencia de sus embriones favorecen el seguimiento *in vivo* del desarrollo, siendo compatible con técnicas de microscopía avanzada y

manipulación genética (Lieschke & Currie, 2007). Asimismo, existen guías bioéticas bien establecidas que regulan su uso en el laboratorio de investigación (American Fisheries Society et al., 2014; Westerfield, 2000; ZFIN, 2025).

El pez cebra presenta notables similitudes ontogénicas con los mamíferos, incluido el humano, lo que ha permitido su empleo como modelo en el estudio del desarrollo órgano-tisular (Menke et al., 2011; Zang et al., 2018). Un ejemplo claro es el desarrollo pancreático. El páncreas del pez cebra mantiene la organización clásica, con una porción exocrina encargada de la producción de enzimas digestivas y una porción endocrina compuesta por células α productoras de glucagón, células β productoras de insulina y células δ secretoras de somatostatina (Tiso et al., 2009). Ontogénicamente, este órgano se forma a partir de los primordios dorsal y ventral originados en el endodermo del intestino anterior, regulados por factores como Pdx1 y FGF, en un proceso análogo al humano (Prince et al., 2017).

Los primordios aparecen a las 24 hpf y hacia las 48 hpf ocurre la rotación del primordio ventral y su posterior fusión con el dorsal (Matsuda, 2018). En el pez cebra, la yema dorsal genera exclusivamente células endocrinas, mientras que la ventral contribuye tanto a las exocrinas (acinares y ductales) como a una segunda oleada de células endocrinas, conformando un islote principal de gran tamaño (Prince et al., 2017; Matsuda, 2018). Para los 3 dpf, los primordios se encuentran fusionados y ya se observan islotes pancreáticos diferenciados, uno principal, derivado del primordio dorsal, y múltiples islotes secundarios más pequeños derivados del ventral (Matsuda, 2018). En este punto, la diferenciación celular sigue un patrón conservado con el humano, primero emergen las células β productoras de insulina, seguidas de las células α productoras de glucagón. Desde su diferenciación y madurez morfológica, las células β responden al aumento de glucosa con la liberación de insulina, lo que confirma la funcionalidad metabólica del páncreas a etapas muy tempranas (Matsuda, 2018).

En la etapa adulta, el pez cebra conserva órganos clave implicados en la homeostasis energética que son fisiológicamente comparables con los de los mamíferos, como el hígado, el músculo, el tejido adiposo y el páncreas (Menke et al., 2011). Esta similitud ha permitido establecer paralelismos con el mamífero para el estudio de los mecanismos que regulan el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas (Zang et al., 2018). Adicionalmente, se dispone de un amplio repertorio de técnicas y metodologías que posibilitan la evaluación del metabolismo glicémico en este modelo, desde la manipulación dietética y farmacológica hasta aproximaciones genéticas y de imagen que permiten estudiar, en tiempo real, la dinámica del metabolismo y sus alteraciones (Gut et al., 2013). A nivel celular, se ha descrito que el mecanismo de reconocimiento de la glucosa por parte de las células β pancreáticas, su respuesta secretora de insulina y los efectos

de esta hormona sobre los tejidos sensibles guardan una alta similitud con lo descrito en los mamíferos (Kim et al., 2009; Pérez Díaz et al., 2025).

Finalmente, el modelo permite evaluar procesos fisiológicos fundamentales, incluyendo la regulación de la función pancreática y su control hormonal, así como la participación de neuropéptidos y factores hipotalámicos en el metabolismo; sugiriendo que la conservación del sistema TRHérgico en el pez cebra (Lazcano et al., 2021) podría abrir una oportunidad para explorar nuevas aproximaciones experimentales en la comprensión de los mecanismos de control metabólico, en particular de la homeostasis glicémica.

4. Justificación

La DM2 es uno de los principales retos de salud pública a nivel mundial y nacional. En México afecta al 10.2 % de la población adulta, equivalente a más de 10 millones de personas, mismas que presentan riesgos de desarrollar complicaciones crónicas, discapacidad y muerte prematura. Esta enfermedad se caracteriza por hiperglicemia persistente debido a alteraciones en la secreción y acción de la insulina. Ante la limitada eficacia de los tratamientos actuales, resulta indispensable investigar estrategias alternativas en la regulación de la glucosa con un potencial enfoque terapéutico.

En este contexto, la TRH se propone como un péptido de interés más allá de su función clásica en la activación del eje tiroideo. Estudios en mamíferos han demostrado que la TRH, así como sus principales elementos de señalización, sus receptores (TRH-Rs) y la enzima degradadora (TRH-DE), se expresan en tejidos periféricos como el hígado, el músculo, la piel, el tracto gastrointestinal y el páncreas. En este último, se ha sugerido que la TRH participa en la modulación de la secreción de la insulina, influyendo en el control de la glucosa en sangre. No obstante, los mecanismos mediante los cuales este sistema regula la función pancreática y metabólica aún no han sido descritos con precisión en mamíferos, lo que resalta la importancia de explorar nuevos modelos experimentales.

El pez cebra (*Danio rerio*) representa un modelo idóneo debido a su alta conservación genética con los mamíferos, su rápido desarrollo embrionario y una fisiología glicémica comparable a la del ser humano. Estas características lo convierten en un organismo adecuado para caracterizar la organización y función del sistema TRHérgico, así como para analizar su influencia sobre la homeostasis de la glucosa. En este estudio se plantea evaluar la conservación evolutiva y los patrones de expresión de este sistema durante el desarrollo temprano, en la etapa adulta, considerando diferencias sexuales, además de determinar su respuesta fisiológica bajo condiciones de hiperglicemia. Con este trabajo se pretende establecer una correlación fisiológica entre la acción de la TRH y su papel en la regulación glicémica, con el objetivo de aportar evidencia que contribuya a una mejor comprensión de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en la DM2.

5. Preguntas de investigación

¿Cuáles son los niveles de expresión de los elementos del sistema TRHérgico durante el desarrollo embrionario, en los tejidos centrales y periféricos del pez cebra adulto, considerando las diferencias entre sexos?

¿Cuál es el efecto de la administración exógena de la TRH sobre los niveles altos de la glucosa, la expresión génica de los componentes del sistema TRHérgico, así como de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa en un modelo de hiperglicemia del pez cebra adulto, considerando las diferencias entre sexos?

6. Hipótesis de investigación

Hipótesis 1

Los componentes del sistema TRHérgico en el pez cebra están evolutivamente conservados y presentan un patrón de expresión ontogenético y tisular específico, mostrando diferencias entre sexos en su etapa adulta.

Hipótesis 2

La administración exógena de la TRH en un modelo de hiperglucemia en pez cebra adulto disminuirá los niveles de glucosa en sangre y modulará de manera diferencial la expresión de los componentes del sistema TRHérgico, así como de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa, presentando respuestas dependientes del sexo.

7. Objetivo General

Caracterizar el sistema TRHérgico en el pez cebra desde una perspectiva evolutiva, ontogenética y tisular, así como evaluar su papel en la regulación de la glicemia, considerando las diferencias entre sexos.

7.1 Objetivos Específicos

1. Analizar y comparar la conservación evolutiva de los componentes del sistema TRHérgico en el pez cebra mediante análisis bioinformáticos comparativos.
2. Evaluar la expresión relativa de los genes del sistema TRHérgico durante el desarrollo temprano del pez cebra.

3. Caracterizar los patrones de expresión génica del sistema TRHérgico en tejidos centrales y periféricos del pez cebra adulto, considerando las diferencias entre sexos.
4. Evaluar el efecto de la administración exógena de la TRH sobre la glicemia, la expresión de genes relacionados con su metabolismo, así como de los componentes del sistema TRHérgico en un modelo de hiperglicemia en pez cebra adulto, diferenciando las respuestas entre machos y hembras.

8. Metodología

8.1 Diseño del estudio

El presente trabajo se desarrolló bajo un diseño experimental con un enfoque integrativo, que incluyó análisis *in silico*, estudios de expresión génica y ensayos funcionales *in vivo* empleando como modelo al pez cebra.

La investigación se estructuró en tres ejes metodológicos principales:

1. **Análisis bioinformático comparativo** dirigido a evaluar la conservación estructural de los componentes del sistema TRHérgico, mediante la construcción de árboles filogenéticos, la caracterización de sus dominios funcionales, propiedades estructurales y el alineamiento de secuencias proteicas.
2. **Estudios de expresión génica** para el estudio de los transcritos del sistema TRHérgico tanto a lo largo del desarrollo embrionario como en tejidos centrales y periféricos de ejemplares adultos, considerando las diferencias asociadas al sexo.
3. **Evaluar el efecto de la aplicación exógena de la TRH sobre un modelo de hiperglicemia en el pez cebra adulto**, con el fin de determinar su efecto sobre los niveles de la glucosa en sangre y la expresión de genes del sistema TRHérgico y de genes asociados al metabolismo de la glucosa, considerando las diferencias en la respuesta entre machos y hembras.

8.2 Modelo animal

Peces cebra adultos (*Danio rerio*) de ambos sexos fueron obtenidos de un criadero comercial y mantenidos en el bioterio del Instituto de Neurobiología (INb) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus Juriquilla. El sistema de alojamiento está compuesto por 15 peceras conectadas a filtros mecánicos, biológicos y circulación hídrica constante que, suministra oxígeno. La sala de mantenimiento estuvo diseñada para reducir vibraciones y ruido ambiental, con

ventilación permanente y control térmico que aseguró temperaturas estables entre 26 °C y 28 °C.

Los parámetros fisicoquímicos del agua se monitorearon semanalmente, manteniendo un fotoperiodo de 10 h luz/14 h oscuridad, temperatura de 28 ± 1 °C, pH entre 7.4–7.8, conductividad de 500–600 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y densidad de 1.001–1.0010 g/ml. La alimentación se realizó dos veces al día con intervalos de seis horas, suministrando *Artemia salina* viva y una dieta comercial de hojuelas (42% proteína, 5% grasa, 6% fibra, 11% cenizas, 8% humedad; Biomaa). El alimento se almacenó en condiciones que previnieron humedad y contaminación.

Cada grupo de peces fue identificado de acuerdo con su fecha de eclosión, tipo de experimento y número de individuos por tanque. El cuidado diario y la supervisión sanitaria estuvieron a cargo del personal técnico especializado del Laboratorio D-03 de Receptores Nucleares y Neurobiología del INb-UNAM.

8.2.1 Nomenclatura

Las abreviaturas de genes y proteínas fueron asignadas siguiendo las convenciones de nomenclatura del pez cebra. Los genes y transcritos de *Danio rerio* se indican en minúsculas y en cursiva (*aaa*), mientras que sus proteínas correspondientes se escriben con inicial mayúscula y sin cursiva (Aaa). En el caso de mamíferos, los genes se representan en mayúsculas y en cursiva (*AAA*), y las proteínas en mayúsculas y en fuente regular (AAA).

8.3 Consideraciones bioéticas y de bioseguridad

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del INb-UNAM y por la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), conforme a los protocolos #152.A y #13830, respectivamente. Las actividades se desarrollaron en apego a las guías internacionales para el cuidado y uso de animales en investigación biomédica (Jones-Bolin, 2012) y a las recomendaciones específicas para el manejo del pez cebra (Westerfield, 2000; ZFIN, 2025).

Asimismo, se implementaron medidas de bioseguridad y bienestar animal orientadas a preservar la integridad fisiológica de los ejemplares. Estas incluyeron el monitoreo constante de parámetros de calidad del agua (pH, temperatura, oxigenación y conductividad), el suministro de alimento en horarios estandarizados y el mantenimiento de densidades poblacionales adecuadas (≤ 5 peces adultos/L de agua), con ajustes proporcionales durante las etapas juveniles y larvarias. Para reducir el estrés, se aplicaron técnicas de manipulación cuidadosa, y tanto la

anestesia como la eutanasia se realizaron mediante el método de choque hipotérmico, a fin de minimizar posibles alteraciones en los niveles de glucosa en sangre (Eames et al., 2010). Los peces fueron rápidamente sumergidos en agua a 12 °C para anestesia y a 4 °C para eutanasia, siguiendo las recomendaciones internacionales previamente citadas, para garantizar un procedimiento humanitario.

8.4 Diseño Experimental

8.4.1 *Objetivo Específico 1. Análisis bioinformático de las secuencias del sistema TRHérgico*

Con el objetivo de evaluar la conservación evolutiva del sistema TRHérgico en el pez cebra, se realizaron análisis *in silico* que incluyeron alineamientos múltiples de secuencias y la construcción de árboles filogenéticos. Se recopilieron secuencias putativas con marco de lectura completo correspondientes a los principales componentes del sistema: el precursor de la hormona (prepro-TRH), isoformas del receptor (TRH-Rs) específicas por especie, y la enzima degradadora de TRH (TRH-DE), obtenidas a partir de las bases de datos Ensembl (<https://www.ensembl.org/>) y NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se seleccionaron secuencias representativas de distintos grupos de vertebrados, considerando mamífero, ave, reptil y anfibio, además del pez cebra (pez). Los números de acceso correspondientes se enlistan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Números de acceso de las secuencias proteicas de los componentes del sistema TRHérgico de los vertebrados

Especie/ Proteína	Pre pro-TRH	TRH-Rs			TRH-DE
		TRH-R1	TRH-R2	TRH-R3	
<i>Homo sapiens</i>	ENSP00000303452	NP_003292.1	N/A	N/A	ENSP00000261180
<i>Rattus norvegicus</i>	ENSRNOP00055005256	NP_037179.1	EDL92741.1	N/A	ENSRNOP00065017403
<i>Gallus gallus</i>	ENSGALP00010032092	NP_990261.2	N/A	XP_004947106.2	XP_040515514.1
<i>Anolis carolinensis</i>	XP_003217792.2	XP_008106456.1	N/A	N/A	XP_062838686.1
<i>Xenopus tropicalis</i>	AAA49974.1	CAD12658.1	CAD12657.1	XP_002933212.1	XP_002939988.3
<i>Danio rerio</i>	ENSARP00000021167	ENSXDART00000181721.1 (TRH-R1a) ENSXDART00000052509.7 (TRH-R1b)	ENSXDART00000140654.2	XM_688966.3	ENSXDARP00000083559

Grupo externo					
<i>Caenorhabditis elegans</i>	C30H6.8	C30F12.6	N/A	N/A	N/A
<i>Drosophila melanogaster</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	AAF56882.2

Los grupos externos incluidos en la tabla se emplearon para la construcción de los árboles filogenéticos. Los alineamientos múltiples de las secuencias se realizaron con el programa Clustal Omega 2025, mientras que la representación gráfica de dichos alineamientos se generó con el programa ESPript. Los árboles filogenéticos (**Figura 8**) se construyeron con el programa MEGA X (versión 7.0) utilizando el método de máxima verosimilitud. Adicionalmente, se elaboraron representaciones visuales de las estructuras moleculares de cada componente del sistema TRHérgico del pez cebra empleando el programa IBS. Con base en estudios previos (Chávez-Gutiérrez et al., 2006; Galas et al., 2009; Heuer et al., 1998; Lazcano et al., 2021; Saito et al., 2011; Wallis, 2010), se realizó un análisis comparativo que permitió identificar regiones conservadas y dominios funcionales entre especies, destacando la conservación evolutiva y funcional de los componentes del sistema TRHérgico en el pez cebra.

8.4.2 Objetivos Específicos 2 y 3. Evaluación de la expresión relativa durante el desarrollo temprano y en tejidos adultos, diferenciada por sexo

8.4.2.1 Recolección de muestras de embriones y en larvas

Los embriones se obtuvieron mediante cruzas controladas de reproductores adultos mantenidos en cámaras de apareamiento provistas con mallas para evitar la depredación de los huevos. Las etapas de desarrollo se clasificaron de acuerdo con los criterios establecidos por Kimmel et al. (1995). Los embriones recién fertilizados se consideraron como 0 dpf y posteriormente se recolectaron en los estadios 0.5 dpf (12 hpf), 1 dpf, 2 dpf, 3 dpf, 4 dpf y 5 dpf. A partir de 3 dpf los organismos fueron considerados como larvas de vida libre. Todos los ejemplares fueron mantenidos e incubados en medio E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄ y azul de metileno) a 28 ± 1 °C.

Cada réplica biológica consistió en un conjunto (pool) de 10 embriones o larvas, recolectados cuidadosamente con puntas de pipeta de diámetro amplio para evitar daño mecánico (Vergauwen et al., 2018). Los ejemplares fueron eutanizados mediante inmersión en medio E3 preenfriado a 4 °C, procedimiento que induce anestesia por hipotermia seguida de pérdida irreversible de las funciones vitales,

conforme a las guías aceptadas para la eutanasia de larvas de pez cebra (ZFIN, 2025). Inmediatamente después de la eutanasia, las muestras fueron preservadas en Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

8.4.2.2 Recolección de tejidos en adultos

Los peces adultos (≥ 3 meses post-fertilización, mpf) fueron anestesiados y eutanizados mediante choque hipotérmico bajo las condiciones previamente descritas. El sexo se determinó con base en caracteres sexuales secundarios, como la pigmentación amarilla en la aleta anal y región ventral en machos, y la distensión abdominal en hembras (Robison et al., 2008), clasificación que fue confirmada mediante inspección gonadal.

Después de la eutanasia se realizó la disección inmediata de los siguientes tejidos: cerebro (desde telencéfalo hasta cerebelo), retina, corazón, hígado, páncreas, músculo, piel y tracto gastrointestinal completo. Para el análisis de expresión se procesaron cinco réplicas biológicas independientes de cada tejido, con excepción del páncreas y el corazón, que debido a su menor tamaño, cada replica estuvo conformada por pools de tres individuos. Las muestras fueron preservadas en Trizol y almacenadas a -80°C hasta su análisis molecular. El procedimiento detallado de disección pancreática se describe en el **Anexo 1**.

8.4.2.3 Análisis de expresión génica

La expresión relativa de los transcritos se determinó mediante RT-qPCR, conforme al protocolo detallado en la **sección 8.5**.

8.4.3 Objetivo Específico 4. Evaluar el efecto de la TRH en un modelo de hiperglicemia en el pez cebra adulto

Con el fin de evaluar el papel funcional de la TRH en la regulación de la homeostasis glicémica, se implementó un modelo experimental de hiperglicemia en peces cebra adultos durante tres días consecutivos (**véase Tabla 4, donde se resume el diseño experimental**), siguiendo el protocolo previamente descrito por Capiotti et al. (2014).

Tabla 4. Diseño experimental del tratamiento *in vivo* con TRH sobre el modelo hiperglicémico del pez cebra

		Inicio experimental			Fin del experimento
Día	Adecuación (7 días)	cero	uno	dos	tres
Grupo 1. Control + inyección de vehículo (salina 0.9%) (n=15)					
Actividad	Adecuación	Inmersión en agua de pecera. Inyección <i>ip</i> salina	Se mantienen en agua de pecera. Inyección <i>ip</i> salina	Se mantienen en agua de pecera. Inyección <i>ip</i> salina	Sacrificio y muestreo.
Grupo 2. Glucosa 2% + inyección de vehículo (salina 0.9%) (n=15)					
Actividad	Adecuación	Inmersión en solución de glucosa. Inyección <i>ip</i> salina	Se mantienen en solución de glucosa. Inyección <i>ip</i> salina	Se mantienen en solución de glucosa. Inyección <i>ip</i> salina	Sacrificio y muestreo.
Grupo 3. Glucosa 2% + inyección de 1 µg/g peso corporal de TRH (n=15)					
Actividad	Adecuación	Inmersión en solución de glucosa. Inyección <i>ip</i> TRH	Se mantienen en solución de glucosa. Inyección <i>ip</i> TRH	Se mantienen en solución de glucosa. Inyección <i>ip</i> TRH	Sacrificio y muestreo.

Tras el periodo de aclimatación bajo condiciones controladas de laboratorio, un total de 45 peces cebra adultos (≥ 3 meses post-fertilización) fueron asignados aleatoriamente a tres grupos experimentales (n = 15 por grupo).

Los grupos experimentales se definieron de la siguiente manera:

- (i) grupo control, mantenido en agua libre de glucosa y sometido a inyección intraperitoneal (*ip*) diaria de vehículo (solución salina estéril al 0.9%);
- (ii) grupo glucosa, expuesto a una solución de D-glucosa 111 mM (2%) durante tres días consecutivos y recibiendo inyección *ip* diaria de vehículo;
- (iii) grupo glucosa + TRH, expuesto a la misma concentración de glucosa pero tratado simultáneamente con inyecciones *ip* diarias de TRH.

Los experimentos se realizaron de manera independiente para machos y hembras con el fin de evaluar posibles respuestas dependientes del sexo. Este diseño

experimental permitió determinar el efecto de la TRH sobre los niveles de glucosa en sangre bajo condiciones de hiperglicemia inducida, así como analizar su impacto en la expresión de genes asociados tanto a la señalización del sistema TRHérgico (*trh*, *trh-rs*, *trh-de*) como al metabolismo glicémico (*insa*, *ins-ra*, *ins-rb*, *slc2a2* y *slc2a12*).

8.4.3.1 Modelo de inducción de hiperglicemia

Los peces adultos fueron expuestos diariamente a una solución de glucosa al 2% (111 mM) durante tres días consecutivos (**Tabla 4**) (Capiotti et al. 2014). La solución de trabajo se preparó a partir de un concentrado inicial al 50% (PiSA Farmacéutica®, Guadalajara, Jalisco, México), diluida en agua del sistema hasta alcanzar la concentración final deseada.

Para minimizar el estrés y prevenir sesgos en la respuesta metabólica, los ejemplares fueron mantenidos bajo condiciones ambientales y fisicoquímicas estables y controladas, que incluyeron una manipulación cuidadosa, el monitoreo constante de la temperatura y el pH del agua, una adecuada aireación y el suministro de alimento en horarios estandarizados.

El grupo control fue sometido al mismo régimen de manipulación, pero mantenido en agua libre de glucosa.

8.4.3.2 Tratamiento con la TRH

Paralelo a la inducción de hiperglicemia, los peces recibieron inyecciones *ip* durante tres días consecutivos, siguiendo el procedimiento descrito por Kinkel et al. (2010).

La TRH (Bachem, Cat. No. 4038214, Bubendorf, Suiza) se administró a una dosis de 1 µg por gramo de peso corporal (µg/g PC), disuelta en solución salina estéril al 0.9%, en un volumen de 1 µL por gramo de peso corporal, ajustado individualmente según la masa corporal de cada organismo. Con base en la masa corporal, el volumen de inyección osciló aproximadamente entre 0.7 y 1.0 µL por pez. La masa corporal promedio fue de 0.779 ± 0.148 g en machos y 0.897 ± 0.174 g en hembras.

La dosis utilizada fue seleccionada a partir de un ensayo dosis–respuesta evaluando 0.1, 1 y 10 µg TRH/g de PC, con base en estudios previos en otros teleósteos y en modelos murinos (Abbott y Volkoff, 2011; Luo et al., 2008). La dosis de 1 µg/g fue seleccionada por producir una respuesta fisiológica consistente sin inducir signos de estrés ni efectos adversos (**véase Anexo 2**).

Las inyecciones se realizaron una vez al día aproximadamente a las 09:00 h, con el fin de minimizar la variabilidad circadiana. Las inyecciones de vehículo se administraron en volúmenes equivalentes para mantener la consistencia procedimental entre los grupos experimentales.

Con el propósito de estandarizar las condiciones metabólicas, el alimento fue retirado 24 horas antes del muestreo, y 15 minutos antes del sacrificio los peces fueron transferidos a acuarios libres de glucosa para evitar contaminación externa o interferencias en la medición de glucosa.

8.4.3.3 Cuantificación de Glucosa en Sangre

La sangre se obtuvo mediante sección caudal y se aplicó directamente sobre tiras reactivas Accu-Chek® Performa (Roche Diabetes Care, Ciudad de México, México). Las mediciones se realizaron de manera individual e inmediata mediante un glucómetro calibrado, expresándose los valores en mg/dL (Eames et al., 2010).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente para comparar los efectos del tratamiento con TRH entre grupos experimentales y entre sexos.

8.4.3.4 Evaluación de la sensibilidad del modelo de hiperglicemia al tratamiento con insulina

Con el fin de validar la capacidad de respuesta del modelo de hiperglicemia y tener una comparativa con los grupos que recibieron la TRH, se realizó un experimento independiente aplicando insulina como control positivo (**véase Figura 21 en el Anexo 3**). Para ello, peces cebra adultos machos fueron sometidos al mismo protocolo de inmersión en glucosa previamente descrito (**Tabla 4**). Un total de 12 individuos fueron distribuidos en dos grupos experimentales: glucosa + vehículo y glucosa + insulina (n = 6 por grupo).

Se utilizó insulina humana regular (solución inyectable 100 UI/mL; AMSA®, Ciudad de México, México). Los peces recibieron una única inyección *ip* de insulina a una dosis de 1 UI/kg de peso corporal, administrada en un volumen de 1 µL por gramo de peso corporal, siguiendo el protocolo descrito por Capiotti et al. (2014). La solución inicial concentrada de insulina (100 UI/mL) fue diluida inmediatamente antes de su uso en una proporción 1:100 en solución salina estéril al 0.9%, obteniéndose una concentración de trabajo de 1 UI/mL (0.001 UI/µL), ajustada individualmente al peso corporal de cada pez.

Previo a la determinación de glucosa, los organismos fueron transferidos durante 15 minutos en agua libre de la misma y así evitar posibles interferencias en las lecturas. Los niveles de glucosa en sangre fueron cuantificados una hora después de la administración de insulina. Los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 21, Anexo 3**.

8.4.3.5 Disección y análisis de expresión génica relativa

Se recolectaron tejidos metabólicamente relevantes (páncreas, hígado y músculo). El páncreas se procesó como pools de tres individuos por réplica, mientras que el hígado y el músculo se analizaron individualmente, trabajando con un total de cinco réplicas biológicas por tejido.

La expresión relativa de los transcritos se determinó mediante RT-qPCR, conforme al protocolo detallado en la **sección 8.5**.

8.5 Análisis de expresión génica relativa por RT-qPCR

El material biológico obtenido tanto en los experimentos ontogenéticos como en los análisis realizados en adultos bajo condiciones basales (**Objetivos Específicos 2 y 3**), así como en los organismos sometidos al tratamiento con TRH e hiperglicemia (**Objetivo Específico 4**), fue procesado y analizado mediante el mismo protocolo estandarizado de evaluación de expresión génica.

8.5.1 Extracción de RNA

El ARN total se aisló a partir de embriones, larvas y tejidos adultos preservados en Trizol Reagent, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La concentración y pureza del ARN se determinaron mediante espectrofotometría (NanoDrop Lite Plus). Se consideraron los cocientes A260/A280 y A260/A230 como indicadores de pureza. La integridad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

8.5.2 Síntesis de cDNA

Se utilizó 1 µg de ARN total para la síntesis de ADNc empleando el kit RevertAid First Strand ADNc Synthesis, conforme a las instrucciones del fabricante.

8.5.3 PCR en tiempo real (RT-qPCR)

La expresión génica relativa se evaluó mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) con detección basada en SYBR Green, utilizando un sistema QuantStudio 1 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 8 µL, compuesto por 3.3 µL de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific, Cat. No. K0221), 0.32 µL de cada cebador (10 µM) y 2 µL de cDNA (~50 ng), ajustando el volumen final con agua libre de nucleasas. Para muestras de embriones/larvas se utilizó ADNc diluido en una proporción 1:5, mientras que en adultos se empleó ADNc sin diluir.

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Al finalizar cada corrida se efectuó un análisis de curva de disociación para verificar la especificidad de la amplificación.

Todas las reacciones se realizaron en duplicado técnico. La especificidad y eficiencia de los cebadores se validaron mediante curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas de ADNc, previo a la ejecución de los experimentos **(ver Anexo 4)**.

La cuantificación relativa de los transcritos se realizó mediante el método de la doble delta Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$), utilizando la media geométrica de los genes constitutivos para la normalización. En los estudios ontogenéticos (embriones y larvas), se utilizaron *18S rRNA* y *Ism12b* como genes de referencia (Hu et al., 2016), considerando el estadio 0 dpf como calibrador para el análisis comparativo entre etapas del desarrollo temprano.

En los tejidos adultos, la normalización se efectuó utilizando *actb1* (β -actina) y *18S rRNA* como genes de referencia. Para la caracterización y distribución de los componentes del sistema TRHérgico en tejidos centrales y periféricos (Objetivo Específico 3), el tejido cerebral se empleó como muestra calibradora. En contraste, en el modelo de hiperglicemia tratado con TRH (Objetivo Específico 4), el grupo control fue utilizado como calibrador para la comparación relativa de la expresión génica entre los distintos grupos experimentales.

Las secuencias de los cebadores empleados en este estudio se presentan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de genes del sistema TRHérgico y genes relacionados con el metabolismo glicémico.

Gen	Sentido Primer (5'-3')	Antisentido Primer (5'-3')	Amplicón (pb)
<i>trh</i>	TGGAGCCGGAGGTGAGAA	CGAGTGGGGTCCTCTTACGAT	91
<i>trh-r1a</i>	TTTTCTACCACCATCCCCG	TTGACCACCCATAACTGCCG	198
<i>trh-r1b</i>	ACTGTGGAGCAGGGCCTCAT	ATGTCGAGCAGAACTGACGA	295
<i>trh-r2</i>	AAAGACCGGCTGATGGGAGG	GAAGTCCAGGTAGTGCCTGCT	179
<i>trh-r3</i>	GTCTTCGCTCTGCTCTCGTT	CAGTCGGCAGGTCGCTTTGA	191
<i>trh-de</i>	AGAGGTTCTCGGCTCGTGAC	CGAGTCTCGTGGTGTTTCGA	117
<i>insa</i>	TAAGCACTAACCCAGGCACA	TCCTGGGCAGATTTAGGAGGA	151
<i>ins-r1a</i>	CGGTTCTGGGCAAAACAACA	GCAGGCCACGCATTTGTTAG	200
<i>ins-r1b</i>	CGGGGACGATATCCTGCAAA	ACGCATTTGGTGGAGTTCCC	187
<i>slc2a2</i>	TTAACAGGCACGCTCGCTCT	TTCATGCTCTGTGCCATTTCC	167
<i>slc2a12</i>	GGGACAATCCTGGACCACTA	ACATCCCAACCAGCATTCTC	156
<i>actb1</i>	TGAATCCCAAAGCCAACAGAG	CCAGAGTCCATCACAATACCAG	139
<i>18s rRNA</i>	GAACGCCACTTGTCCTCT	GTTGGTGGAGCGATTTGTCT	118
<i>lsm12bs</i>	AGTTGTCCCAAGCCTATGCAATCAG	GACTCGTCTTTATCCTCCTGAGTGG	300

Nota de Tabla: Las abreviaturas corresponden a: *trh*, hormona liberadora de tirotrópina; *trh-rs*, isoformas del receptor de TRH; *trh-de*, enzima degradadora de TRH; *insa*, insulina a; *ins-r1a/ins-r1b*, receptores de insulina a y b; *slc2a2/slc2a12*, transportadores de glucosa 2 y 12. Los genes de *actb1* (β -actina), *18s* (ARN ribosomal 18S) y *lsm12b* (Like-Sm protein 12 homolog b) se emplearon como genes de referencia.

8.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados se realizaron con el software GraphPad Prism versión 10 (GraphPad Software, 225 Franklin Street, Fl. 26, Boston, MA, USA). La decisión de emplear cinco réplicas biológicas por condición experimental se fundamentó en antecedentes metodológicos que han demostrado que este tamaño muestral proporciona un rendimiento adecuado de RNA y garantiza una representación biológica robusta. Esta estrategia es consistente con estudios previos realizados en pez cebra que han utilizado un número similar de réplicas para análisis moleculares comparables (Mills y Gallagher, 2017; Råbergh et al., 2000).

Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). La normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk y, cuando fue pertinente, se verificó la homogeneidad de varianzas. Según el cumplimiento de los supuestos estadísticos, se aplicó la prueba t de Student para comparaciones entre dos grupos o ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey para comparaciones múltiples.

En todos los casos, se consideró un valor de $p < 0.05$ como criterio de significancia estadística. No se excluyeron animales ni muestras del análisis, y no se eliminaron valores atípicos. Los investigadores no estuvieron cegados a la asignación de grupos durante la administración de tratamientos ni durante la evaluación de los resultados.

9. Resultados

9.1 Caracterización *in silico* de las proteínas del sistema TRHérgico en el pez cebra

Con el objetivo de identificar y caracterizar los componentes proteicos del sistema TRHérgico en el pez cebra, de “tal base de datos” se obtuvieron las secuencias de aminoácidos del sistema TRHérgico y se compararon con sus ortólogos pertenecientes a otros vertebrados, incluyendo el humano.

En los vertebrados, la TRH madura deriva de un precursor (pre-proTRH) que contiene un péptido señal y múltiples copias del motivo QHPG (Gln-His-Pro-Gly; proTRH), los cuales están delimitados por residuos dibásicos de lisina (K) y arginina (R). Estos residuos son esenciales para su procesamiento enzimático y constituyen sitios de clivaje necesarios para la maduración de este tripéptido (Joseph-Bravo et al., 2016). En la secuencia putativa del precursor de la Trh en el pez cebra se identificaron siete motivos QHPG altamente conservados (100% similitud molecular) (**Fig. 4**). La mayoría de estos motivos estuvo delimitada por los residuos dibásicos conservados, aunque en los motivos 1 y 2 se detectó un mismo par de residuos compartidos, lo que sugiere un único sitio de clivaje.

Si bien los motivos QHPG mostraron una conservación absoluta (100%) entre especies (**Fig. 4**), los alineamientos de secuencias completas revelaron una similitud moderada de aminoácidos entre el pez cebra y los otros vertebrados (32–46 %). Por su parte, el análisis filogenético confirmó una topología consistente con las relaciones evolutivas previamente establecidas en vertebrados (**Fig. 7A**; Lazcano et al., 2021).

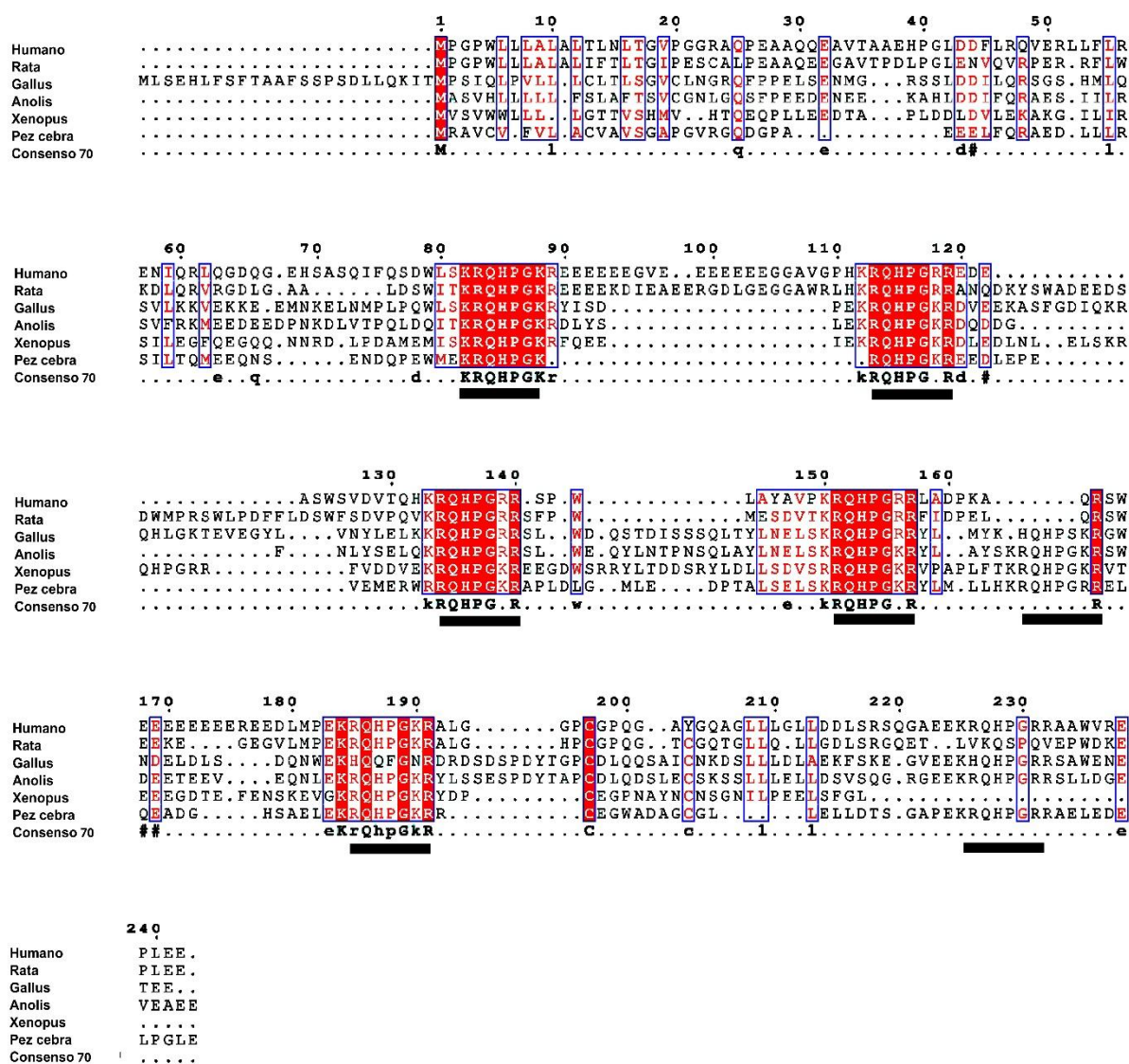


Figura 4. Alineamiento comparativo de las secuencias putativas de aminoácidos de la pre proTRH en vertebrados. Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos deducidas del precursor pre proTRH utilizando ESPrpt 3.0. Se incluyeron especies representativas de vertebrados: mamíferos (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*), aves (*Gallus gallus*), reptiles (*Anolis carolinensis*), anfibios (*Xenopus tropicalis*) y peces (*Danio rerio*). Los residuos idénticos se resaltan en rojo y los residuos con similitud química se enmarcan en azul. Los puntos (·) indican identidad con la secuencia consenso, mientras que los guiones (–) representan residuos no similares. A lo largo del alineamiento se observan claramente los motivos conservados QHPG correspondientes a las secuencias progenitoras de la TRH, y los residuos básicos adyacentes lisina (K) y arginina (R) representan posibles sitios de clivaje para la generación del péptido

maduro. Las barras negras bajo el alineamiento señalan la posición de los motivos proTRH identificados en el pez cebra. Los residuos consenso con una identidad $\geq 70\%$ entre las especies se muestran al final del alineamiento.

En relación con los TRH-Rs, se identificaron cuatro isoformas en el pez cebra (Trh-r1a, Trh-r1b, Trh-r2 y Trh-r3; Saito et al., 2011), cada una codificada por un gen distinto. Los alineamientos mostraron que los siete dominios transmembrana (TM1–TM7) se encuentran altamente conservados, con valores de similitud entre 64–67 % respecto a ortólogos de otros vertebrados, mientras que el análisis de secuencias completas mostró similitudes más moderadas, en un rango del 52–65% (**Fig. 5**). De manera relevante, los residuos esenciales para la unión de la TRH descritos en humanos (Tyr103, Asn110, Tyr282 y Arg306) estuvieron presentes en todas las isoformas de pez cebra (**se señalan en la Fig. 5 con una flecha**), correspondiendo a Tyr105, Asn109, Tyr276 y Arg300 en Trh-r1a; Tyr103, Asn107, Tyr277 y Arg301 en Trh-r1b; Tyr112, Asn116, Tyr287 y Arg311 en Trh-r2; y Tyr153, Asn157, Tyr324 y Arg348 en Trh-r3 (posiciones inferidas mediante homología con los receptores murinos de la TRH; Laakkonen et al., 1996; Perlman et al., 1996).

El análisis comparativo de ortólogos mostró que TRH-R1 está presente en todos los vertebrados analizados en este estudio, mientras que TRH-R2 se detectó únicamente en peces, anfibios y roedores, pero no en el humano. En contraste, TRH-R3 se identificó en vertebrados de linajes más basales como peces, anfibios y reptiles. La reconstrucción filogenética agrupó a los receptores en tres clados principales (tipos 1, 2 y 3), y evidenció que Trh-r3 en pez cebra se encuentra más relacionado con Trh-r1 que con Trh-r2 (**Fig. 7B**).

	1	10	20	30
	MENEIVSE L	NQTQ . LCPRAVVA	LVQVVTIL LV	
	MENEIVSE L	NQIE . LPPQVAVA	LVQVVTIL LV	
	 MD GPS	NVSLIH . GDTTLGLP	EYKVVSVF LV	
	MENGIGDE Q	NHTGLLLSSQEI VT	AEYQVVTIL LV	
	 MENSASPGA	TLGNQTLIGRMPRQP	LELQVVTIL LV	
	ENSTITDG Q	NETE . FLPNQEVVT	IEYQVVTIL LV	
	MDNVFAE L	NATE . LCKREWHG	LEYQVVTIVF LV	
	MENSSKFD SPT	NISLAN . HDIVFSMN	EYKAISVFLV	
	MENOILSIGMOSINA	TGMNEIVGSMPOIA	LEVQVVTISLV	
	 T	FS NGTWTIDNS	VLYKVVSTIL LV	
	ME . NETVF N	ET LETWTIDRS	VYKKAISVLV	
	 MQENVSSRMD TPT	N . SLVGSGDAVTES	LEVYKTVSVF LV	
MQDSDSLSVSKEEEEERGRGLKLILQIWRTELKLLKIRQL	EDQKTSLTSSADPNINS	STIIFTLSSSKPENS	LEVQVVTISLV	
me			Ev ! . ! . !	

TM 1 TM 2 TM 3

40 50 60 70 80 90 100 110

LIICGIGIVCNIMVVLVVRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITDSITYG.SWVYGYVGCCITVLYOYLGINA
VVICGIGIVCNIMVVLVVRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITDSIYG.SWVYGYVGCCITVLYOYLGINA
LLVCTLGIVGNAMVILVLRITSRDMHTPTNGYLVSLALADLLVLAAGLNPVDSLVG.HWIYGRAGCCITVLYOYLGINV
LLICGIGIACNIMVVLVLRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITDSLYK.SWVYGYVGCCITVLYOYLGINA
LLVCGVGIGIACNIMVVLVLRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLLVLAAGLNPITSEV.V.SWVYGYAGCCITVLYOYLGINI
LIICGIGIVCNIMVVMVVRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITDSITYG.SWVYGYLGCCITVLYOYLGINA
VVICGIGIVCNIMVVMVVRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLLVLAAGLNPITDSVYG.SWVYGYTGCCITVLYOYLGINA
LFICGIGIACNIMVVLVVRITRDMHTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPVDSL.VG.TWIIYGHAGCCITVLYOYLGINA
LLICGVGIGIACNIMVVLVLRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLLVLAAGLNPITSEV.V.SWVYGYVGCCITVLYOYLGINI
ILICGVGIGIVCNIMVVLVLRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITSEILFGG.SWVYGYAGCCITVLYOYLGINA
FLICAIIGIVCNIMVVLVLRITKHKMTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITSEILFGG.SWVYGHAGCCITVLYOYLGINA
LLVCGVGIGIACNIMVVLVLRITRDMHTPTNGYLVSLAVADLMVLAAGLNPITSESLMA.TWIIYGHAGCCITVLYOYLGINA
LLICGVIAGIACNIMVVLVLRITKHKMTATNGYLVSLAVADLLVLAAGLNPITSEV.V.SWVYGYGGVITVLYOYLGINV
..!Cg.GivGniMv!\$VVL.tkhm.TptNcYLVSLAVADLMVL.aAGLpn!.#.....W!%G..GCI.ITV.QYLGIN

TM 4

120 130 140 150 160 170 180 190

SSCSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFCTFSRAKKITILVWAFSTSLYCMIMWFFLLDLNISTYVKDAIVISGGYKISRNYYSPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFCTFSRAKKITILVWAFSTSLYCMIMWFFLLDLNISTYVKDAIVISGGYKISRNYYSPI
SSFSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFVCTVSRARRKINAGIVGVSTSLYCLIMWFFLLDLNV...RDNRQLSEGGYKVPRLGLYLPI
SAFSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFCTFSRAKKITILVWVSTSLYCMIMWFFLLDLNIAVYKDTITVSGGYKVSRSYSLXPI
SAKSTAFPTTERRYIAICHAIRKQLCTVARRAKRITSSLIWFTSLYCVLMWFFLDYTSQVTFSDGEQVSGGYRVSRSLSXPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFCTFSRAKKITILVWAFSTSLYCMIMWFFLLDLNIVVYKETTIVAGGYKVPRLYSPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFCTISRRAKKILVWVAFSTSLYCMIMWFFLLDLNITTYKDATVAGGYRVSRSYSPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHPMRAKTIVCTVSRARRKINAGIVWFTSLYCMIMWFFLLDIHV...NKSQGVSGGYKVSRLNLYPI
SACSTAFPTTERRYIAICHSKIAQFCTVSRRAKKILVWVFFTSNMYCVMMWFFLLDITVEKFDAGGVQVAGGYRVSRLNLYPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFMCTLSRAKKITILVWVLTSLYCVMMWFFLLDITREKVVNDNAVLTGGYKVSRLNLYPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHPKIAQFCTLSRAKKITILVWVLTSLYCVMMWFFLLDITREKVVNDNAVLTGGYKVSRLNLYPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHSKIAQFCTVSRARRKINAGIVWFTSLYCMIMWFFLLDIQV...NPDRGVAGGYRVSRLNLYPI
SSCSITAFPTTERRYIAICHSKIAQFCTVSRRAKKILVWVFTSLYCMIMWFFLLDITETVYNSGVQVAGGYRVSRLNLYPI

SScSttAFPTTERRYIAICHPi.Aq..CT.sRAKk.IT..vW.ftS.YC.lWffLLD...y.d...v.CgY.VsR..Y.FPI

TM 5

200	210	220	230	240	250	260
YLMDFFVFYVVMILATVLYGFIARILFLNPIPSPDKENSKIWKNDSTHQNTN...LVNVTNRCFNSTVSRKQVTKM						
YLLDFAVFFIGLLVLVLYGLIGRILFQSPLSQEA.....WQKER.....QPHGQSEAAPGNCSTVSRKQVTKM						
YMMDFGIFYVYVLMGLATVLYGLIARILFLNPIPSPDKENSKIWNHMDMAQNKKT...VNSKMNKSFNSTVSRKQVTKM						
YFLDFAVFFYVFLMGLAATVLYGLIARILYMSPLPAAPQHALG...SAHRG.....GSLQQSCQGSRGTVSRKQVTKM						
YMMDFGIFYVYVPMIATVLYGLIARILFLNPIPSPDKENSKIWKNGSSPPNKT.....KTNKVINSATVSRKQVTKM						
YLIDFGIFYAVVMIATVLYGLIARILFLNPIPSPDKENSKIWNHVDTHQNK...FNSKMNCSRCNSTVSRKQVTKM						
YLADFAIFYVTVLLVATVLYGLIGRILFSLSPIPHPESITERWREKSSKEKNESETEGNKPSNLKTKGALVSRKQVTKM						
YFLDFAIFFYVFLVLATVLYGLIARILFMNPLPSPDKQDLSRMSSSKHYGKP...Y...NSIKLSGKGKNKNTVSRKQVTKM						
YFTDYAVFFYVFLLATVLYGLIARILFLNPLPSPDKESRNWNKKES...S...VHGNSRSSNSTTVSRKQVTKM						
YFFDFGIFYVFLVLATVLYGLIARILFLNPLPSPDKKEKNGCHGSKAKR...NKLKSSRCSCSTVSRKQVTKM						
YLIDFTIFYVFLLLATVLYGLIARILYLNPLPHPDSGTVIAPFL...RSCKEPADGCKAIVRGRPKSAVSRKQVTKM						
YLLDFIIFYVFLVLATVLYGLIARILFRDPSSNTSNQR...FTAQQGR...Q...NSLKVICKPNKAVSRKQVTKM						
Y.DGIFGV.PS.la.vLYGLIARILFLNPIP.p.dp.....NSLKVICKPNKAVSRQVTKM						

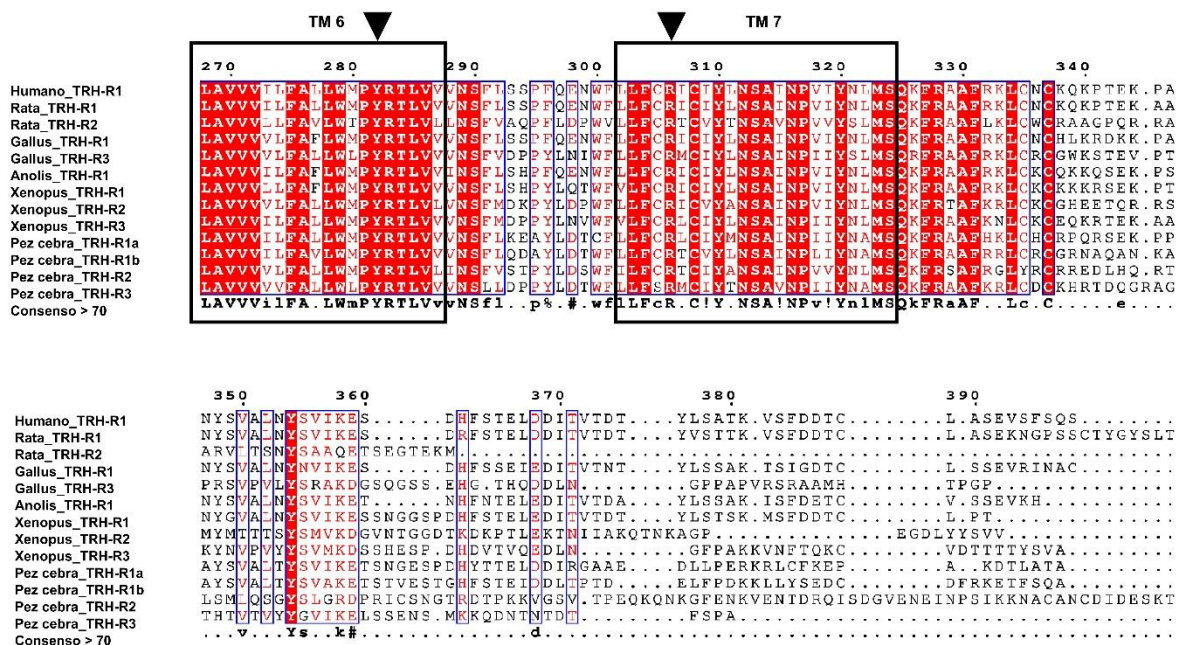


Figura 5. Alineamiento comparativo de las secuencias putativas de los aminoácidos de los TRH-Rs en vertebrados. Se generó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos deducidas de las isoformas de los receptores de TRH (TRH-Rs) utilizando ESPrpt 3.0. Se incluyeron especies representativas de vertebrados: mamíferos (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*), aves (*Gallus gallus*), reptiles (*Anolis carolinensis*), anfibios (*Xenopus tropicalis*) y peces (*Danio rerio*). Los residuos idénticos se muestran en rojo, mientras que aquellos con similitud química se enmarcan en azul. Los puntos (·) indican residuos idénticos a la secuencia consenso y los guiones (–) representan residuos no similares. Los dominios transmembrana predichos (TM1–TM7), definidos con base en la secuencia de referencia humana de TRH-R, se indican mediante recuadros negros. Asimismo, se señalan con cabezas de flecha negras los residuos conservados propuestos como críticos para la unión del péptido TRH, incluyendo tirosina (Tyr) y asparagina (Asn) en TM3, tirosina (Tyr) en TM6 y arginina (Arg) en TM7. Los residuos consenso con $\geq 70\%$ de identidad entre especies se muestran al final del alineamiento. La numeración de residuos corresponde a la secuencia de referencia humana.

Por su parte, el análisis de la proteína Trh-de en el pez cebra mostró identidades del 67–69% frente a ortólogos de otros vertebrados (**Fig. 6**). La secuencia presentó los elementos estructurales característicos de la familia M1 de las metaloproteinasas dependientes de zinc, incluyendo un dominio transmembrana, el motivo catalítico (HEXXHX18E) y el motivo exopeptidasa (AAMEN) (Bauer, 1994; Charli et al., 1998). Se identificaron residuos altamente conservados implicados en el reconocimiento del sustrato de la TRH y en la orientación del grupo piroglutamil, entre ellos Ser227, Tyr361, Ala363, Glu365 y Lys421. Asimismo, se conservaron residuos esenciales para la actividad catalítica, como His399, Glu400, His403, Glu422 y Tyr486, los cuales participan en la coordinación del ion zinc y en la orientación y activación de una molécula de agua como nucleófilo, favoreciendo la reacción de hidrólisis y la estabilización del estado de transición (**Fig. 6**). Adicionalmente, se detectó un posible sitio de fosforilación intracelular (Thr29), propuesto como diana regulada por proteína quinasa C (PKC), lo que sugiere un mecanismo de control postraducciona l de la actividad enzimática. Finalmente, el análisis filogenético confirmó las relaciones evolutivas entre las proteínas TRH-DE de vertebrados, reforzando la hipótesis de una conservación funcional de esta enzima en el pez cebra (**Fig. 7C**).

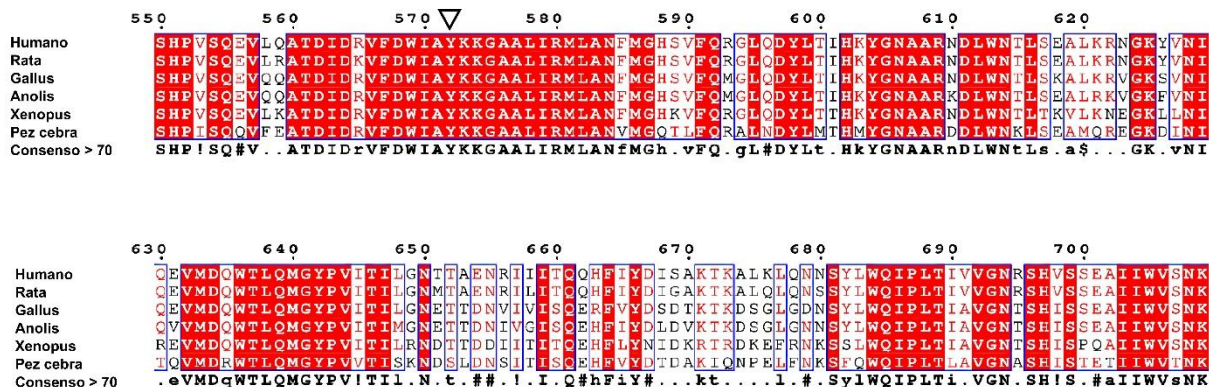


Figura 6. Alineamiento comparativo de las secuencias putativas de aminoácidos de la TRH-DE en vertebrados. Se generó un alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos deducidas de ortólogos de la TRH-DE utilizando ESPrpt 3.0. Se incluyeron especies representativas de vertebrados: mamíferos (*Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*), aves (*Gallus gallus*), reptiles (*Anolis carolinensis*), anfibios (*Xenopus tropicalis*) y peces (*Danio rerio*). Los residuos idénticos se resaltan en rojo, mientras que aquellos con similitud química se enmarcan en azul. Los puntos (·) indican residuos idénticos a la secuencia de referencia humana, y los guiones (–) representan huecos o posiciones no conservadas. El alineamiento destaca los motivos canónicos de las metaloproteasas dependientes de zinc de la familia M1, incluyendo el dominio transmembrana, el motivo exopeptidasa AAMEN y el motivo catalítico HEXXH₁₈E, los cuales se indican mediante recuadros negros. Las cabezas de flecha negras señalan los residuos propuestos como participantes en el reconocimiento del sustrato de TRH (Ser227, Tyr361, Ala363, Glu365 y Lys421), mientras que las cabezas de flecha blancas indican los residuos catalíticamente esenciales involucrados en la hidrólisis del enlace peptídico (His399, Glu400, His403, Glu422 y Tyr486). Una flecha negra adicional indica un posible sitio de fosforilación intracelular (Thr29), potencialmente regulado por proteína cinasa C (PKC). La numeración de los residuos corresponde a la secuencia de referencia humana.

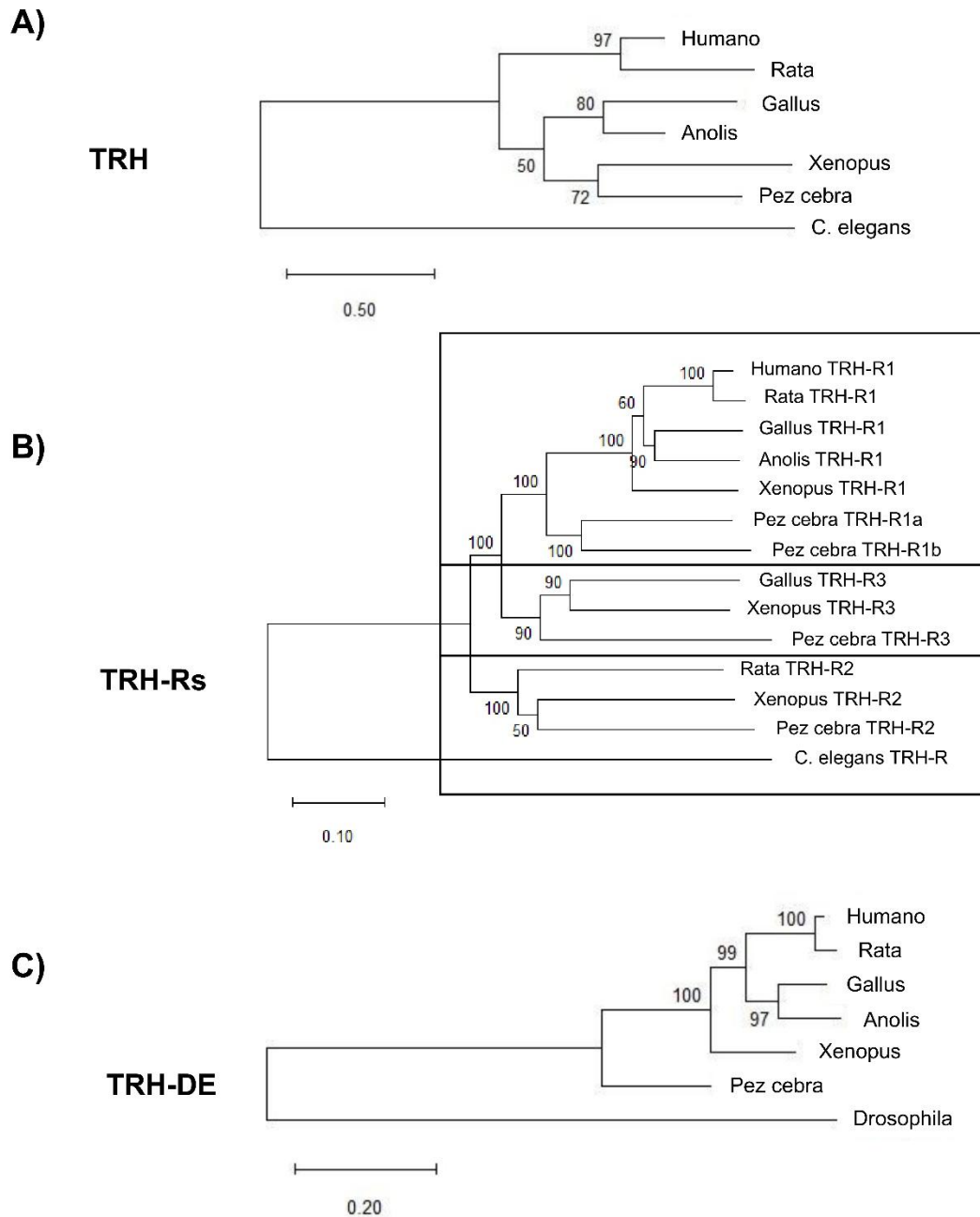


Figura 7. Análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de TRH, TRH-Rs y TRH-DE. La figura presenta los árboles filogenéticos de **A)** TRH, **B)** sus receptores (TRH-Rs) y **C)** su enzima degradadora (TRH-DE). La historia evolutiva fue inferida mediante el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Se muestran los árboles óptimos, con una longitud total de ramas de 3.220. El porcentaje de réplicas en las que los taxones asociados se agruparon en la prueba de bootstrap (1,000 réplicas) se indica junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Los árboles se representan a escala, con longitudes de ramas proporcionales a las distancias evolutivas utilizadas para la inferencia filogenética. Las distancias

evolutivas fueron calculadas utilizando el método de corrección de Poisson (Zuckerandl y Pauling, 1965) y se expresan como el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. El análisis incluyó un total de catorce secuencias de aminoácidos. Para manejar posiciones ambiguas, se aplicó la opción de eliminación por pares en cada comparación de secuencias, lo que resultó en un conjunto final de 562 posiciones. Los análisis filogenéticos fueron realizados con el software MEGA12. Figura creada con BioRender.com (número de acuerdo: AF28PRKRQR).

A partir del análisis estructural y funcional, se elaboraron representaciones moleculares de los componentes del sistema TRHérgico en el pez cebra, destacando los residuos clave que respaldan su actividad funcional (**Fig. 8**).

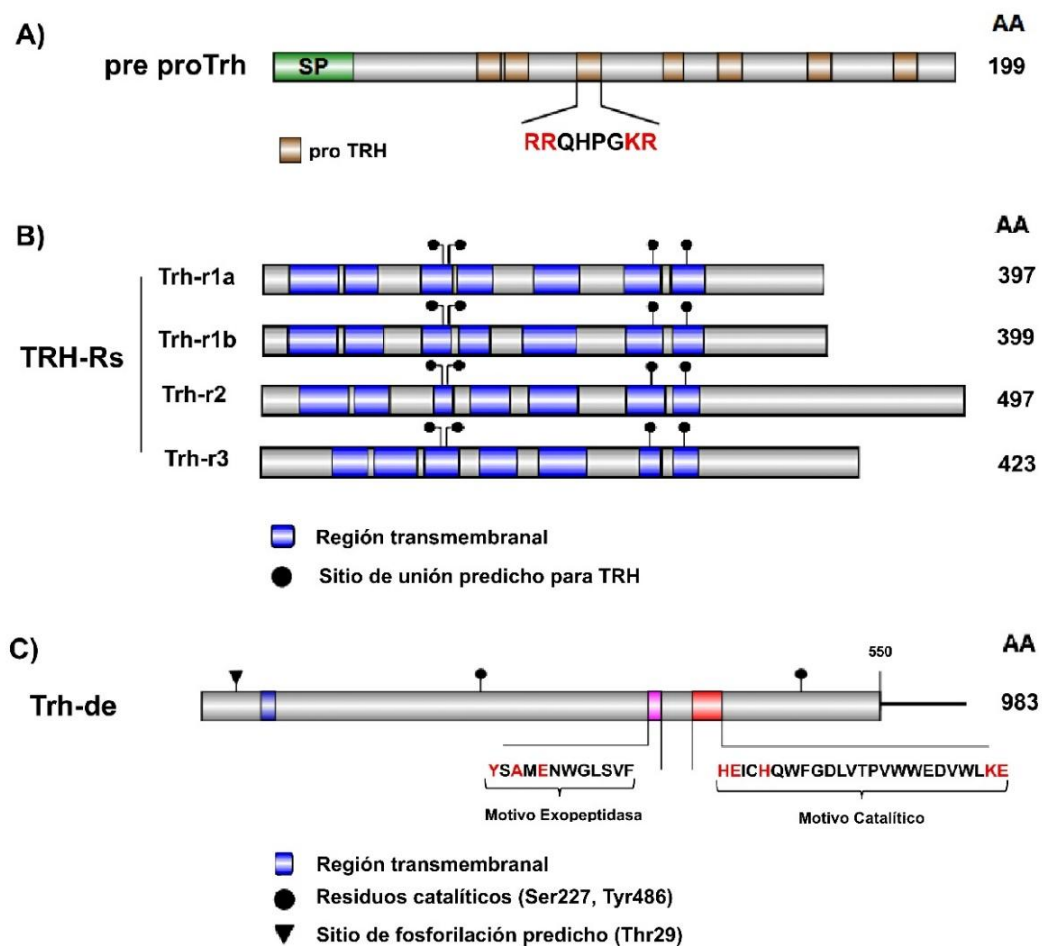


Figura 8. Representación esquemática de la organización molecular del sistema TRHérgico en el pez cebra. (A) Estructura del precursor pre proTrh, mostrando el péptido señal y los motivos proTRH con el motivo conservado QHPG. (B) Isoformas de los receptores de TRH (Trh-r1a, Trh-r1b, Trh-r2 y Trh-r3) con su topología de siete dominios transmembrana y los residuos conservados asociados a la unión del péptido. (C) Representación de Trh-de que incluye el dominio transmembrana, los motivos exopeptidasa y catalítico, así como los residuos clave para el reconocimiento del sustrato y la actividad enzimática. Se indica además el número total de aminoácidos (AA) de cada proteína.

9.2 Análisis ontogénico de la expresión de *trh*, *trh-rs* y *trh-de* en el pez cebra

El análisis de la expresión relativa de los componentes del sistema TRHérgico durante el desarrollo temprano del pez mostró patrones específicos y dinámicos (**Fig. 9**). La expresión del gen *trh* resultó indetectable en embriones recién fecundados (0 dpf), comenzando a expresarse a partir de los 0.5 dpf y mostrando un incremento progresivo hasta los 5 dpf.

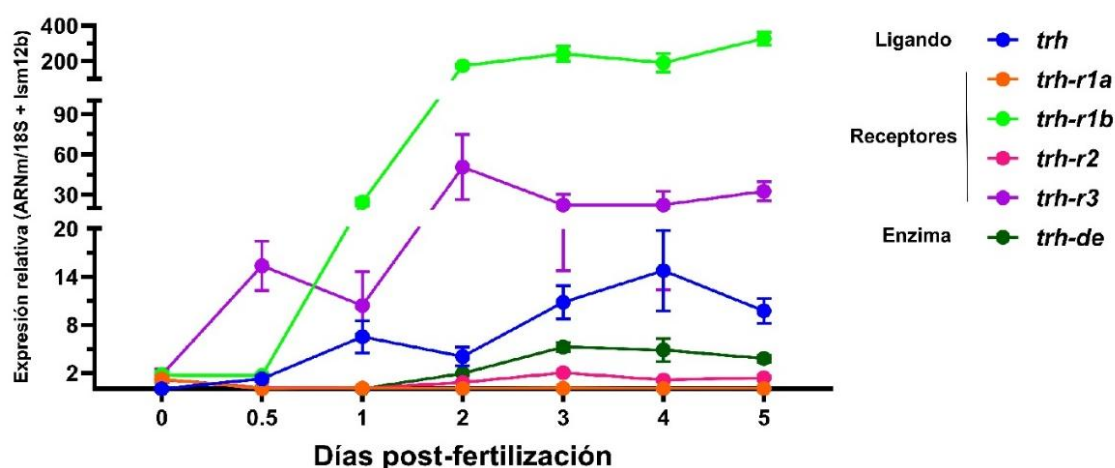


Figura 9. Expresión relativa de *trh*, *trh-rs* y *trh-de* durante el desarrollo temprano del pez cebra. La expresión génica fue evaluada mediante RT-qPCR durante el desarrollo del pez cebra (0–5 dpf). Los valores de expresión se presentan como media $\pm$ error estándar (SEM). Para el análisis de expresión relativa, la etapa de 0 dpf se utilizó como referencia, excepto en el caso de *trh*, cuya normalización se realizó a 12 hpf debido a la ausencia de expresión detectable en 0 dpf. En cada etapa del desarrollo se analizaron cinco réplicas, cada una compuesta por un grupo de 10 ejemplares. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía

seguido de la prueba post hoc de Tukey. La significancia estadística se representa de la siguiente manera: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

En cuanto a los receptores, *trh-r3* presentó un pico de expresión a los 2 dpf, seguido de una ligera disminución a los 3 dpf y un aumento moderado en los días subsecuentes. Por el contrario, *trh-r1b* mostró un aumento sostenido desde 1 dpf, alcanzando a los 5 dpf un nivel de expresión aproximadamente de 300 veces superior al basal, siendo la isoforma más abundante durante el desarrollo temprano del pez. En contraste, *trh-r1a* y *trh-r2* mantuvieron niveles bajos de expresión y relativamente constantes a lo largo del periodo analizado.

La expresión de *trh-de* se mantuvo baja y estable a lo largo de los estadios, lo que sugiere que la degradación enzimática de Trh podría ser mínima en etapas tempranas. Finalmente, el perfil global obtenido sugiere la ausencia de la contribución de transcritos maternos.

9.3 Perfil tisular y dimorfismo sexual en la expresión de *trh*, *trh-rs* y *trh-de* en el pez cebra adulto

El análisis de la expresión en tejidos centrales y periféricos del pez cebra reveló patrones tejido-específicos y modulados por el sexo. Como se esperaba, la expresión relativa de *trh* en el cerebro fue más de diez veces superior a la observada en la retina, corazón, hígado, músculo y páncreas (**Fig. 10**), interesantemente, órganos de relevancia en la homeostasis glicémica. Niveles bajos de expresión se detectaron en la piel y en el tracto gastrointestinal (GI). Finalmente, solo se observó dimorfismo sexual en el hígado, el cual presentó mayor expresión en machos.

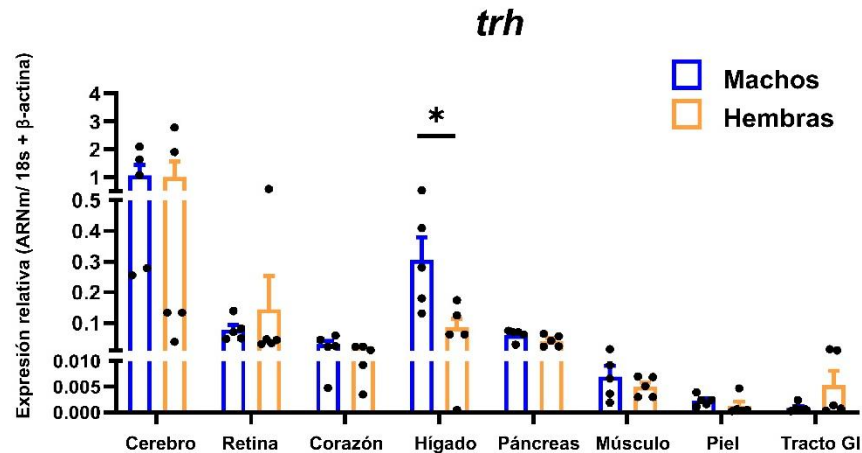


Figura 10. Expresión relativa del ARNm de *trh* en diferentes tejidos de peces cebra machos y hembras. La expresión génica fue determinada mediante RT-qPCR y normalizada utilizando el cerebro como tejido de referencia. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM); las barras en azul corresponden a machos y las barras en naranja a hembras. Para cada tejido se analizaron $n = 5$ réplicas biológicas. Las diferencias entre sexos dentro de cada tejido se evaluaron mediante prueba t de Student no pareada y bilateral. La significancia estadística se indica como $p < 0.05$ (*). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

En cuanto a los *trh*-rs, su máxima abundancia fue en el cerebro y la retina (**Fig. 11**). Entre ellos, *trh-r1a* fue la isoforma más abundante y se expresó en todos los tejidos periféricos analizados, con niveles particularmente elevados en el corazón, el hígado, el páncreas, la piel y el tracto GI, siendo significativamente más altos en el corazón e hígado de los machos (**Fig. 11A**). En contraste, *trh-r1b* no se expresó en el corazón, el hígado y el páncreas, además de niveles bajos en la retina y en el músculo fueron observados; aunque, la piel de las hembras mostró una expresión significativamente mayor (**Fig. 11B**). Por su parte, *trh-r2* demostró un patrón de expresión comparable al de *trh-r1a* en el cerebro y la retina, aunque con baja expresión periférica, salvo en la piel de los machos, donde fue significativamente más elevado (**Fig. 11C**). Finalmente, *trh-r3* se detectó en el cerebro y en la retina y, en menor proporción, en tejidos periféricos; se observaron diferencias entre sexos caracterizadas por una mayor expresión en la piel de los machos y en el tracto GI de las hembras (**Fig. 11D**).

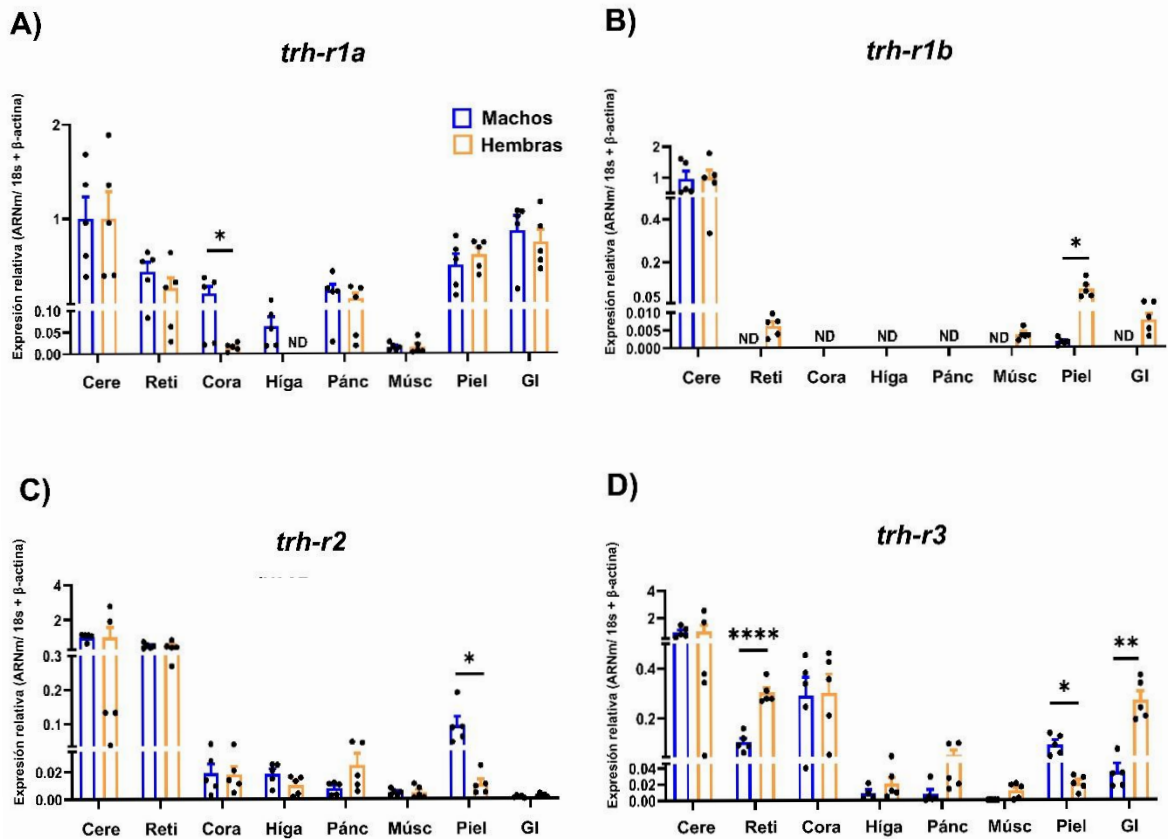


Figura 11. Expresión relativa de los transcritos de los receptores de TRH en tejidos de pez cebra. La expresión relativa del ARNm de (A) *trh-r1a*, (B) *trh-r1b*, (C) *trh-r2* y (D) *trh-r3* fue cuantificada mediante RT-qPCR en cerebro (Cere), retina (Reti), corazón (Cora), hígado (Híga), páncreas (Pánc), músculo (Músc), piel (Piel) y tracto gastrointestinal (GI) de peces cebra adultos machos y hembras. La expresión génica fue normalizada utilizando el cerebro como tejido de referencia y empleando β -actina y 18S rRNA como genes constitutivos. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM); las barras en azul corresponden a machos y las barras en naranja a hembras. Para cada tejido se analizaron $n = 5$ réplicas biológicas; los tejidos fueron procesados de manera individual, excepto el páncreas y el corazón, que se analizaron como pools de tres tejidos por réplica. Las diferencias entre sexos dentro de cada tejido se evaluaron mediante una prueba t de Student no pareada y bilateral. La significancia estadística se indica como sigue: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****). ND indica transcritos no detectados. Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

De manera consistente con el patrón de expresión de los demás componentes del sistema TRHérgico, la expresión de *trh-de* fue más abundante en el cerebro y en la retina (**Fig. 12**), aunque se detectó en todos los órganos periféricos analizados. Se evidenciaron diferencias significativas entre el sexo en el hígado, el páncreas, el músculo y el tracto GI, en todos los casos con niveles superiores en hembras.

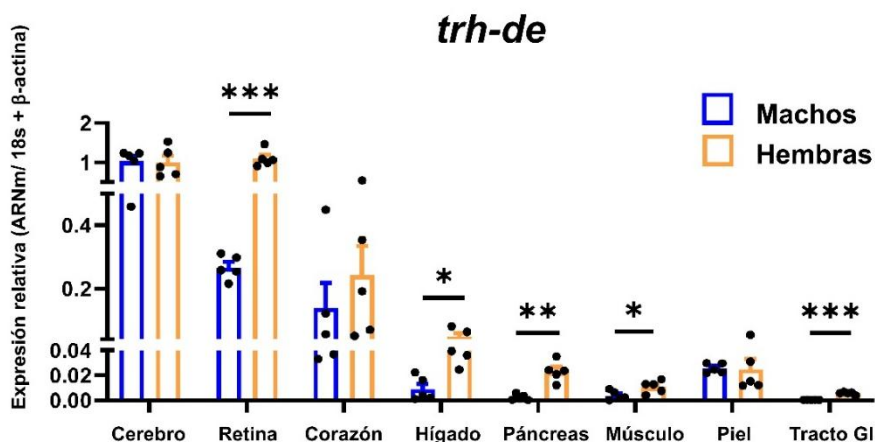


Figura 12. Expresión relativa de *trh-de* en tejidos de pez cebra. La expresión de *trh-de* fue cuantificada mediante RT-qPCR en tejidos centrales y periféricos de peces cebra adultos machos y hembras. Los niveles de expresión fueron normalizados utilizando el cerebro como tejido de referencia. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM); las barras en azul corresponden a machos y las naranjas a hembras. Para cada tejido se analizaron $n = 5$ réplicas biológicas; los tejidos fueron procesados de manera individual, excepto páncreas y corazón, que se analizaron como pools de tres tejidos por réplica. Las diferencias entre sexos dentro de cada tejido se evaluaron mediante prueba t de Student no pareada y bilateral. La significancia estadística se indica como $p < 0.01$ (**) y $p < 0.0001$ (***). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

9.4 Efecto de la TRH sobre los niveles de glucosa en sangre en un modelo de hiperglicemia

Se evaluó el efecto de la administración exógena de la TRH sobre la regulación de la glicemia en ambos sexos, durante un periodo de tres días (**Tabla 5**).

En machos, la administración *ip* de la TRH redujo significativamente los niveles de glucosa en sangre (76.9 ± 5.8 mg/dL), lo que representó una disminución aproximada del 53 % en comparación con el grupo hiperglicémico (161.7 ± 10.2 mg/dL). Los valores obtenidos después del tratamiento resultaron similares a los niveles de glicemia reportados en peces bajo condiciones basales sin ayuno ($60\text{--}80$ mg/dL; **anexo 3**) y se aproximaron a los observados en el grupo control (52.8 ± 3.4 mg/dL) (**Fig. 13A**). En contraste, en hembras, la administración de la TRH no produjo un efecto significativo sobre la glicemia (106.7 ± 6.1 mg/dL) en comparación con el grupo hiperglicémico (111.3 ± 5.6 mg/dL) (**Fig. 13B**). Estos resultados muestran una diferencia sexual en la respuesta glicémica a la TRH bajo las mismas condiciones experimentales.

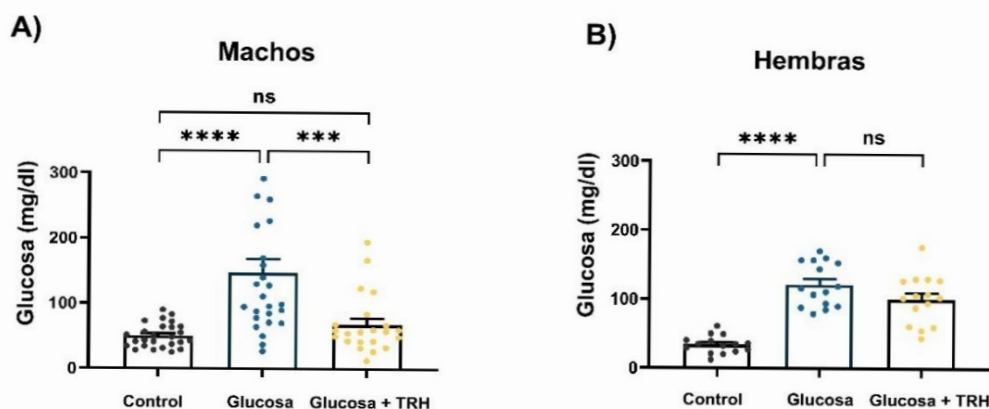


Figura 13. Efecto de la administración de la TRH sobre la glicemia en peces cebrá adultos en un modelo de hiperglicemia. (A) Peces cebrá machos y (B) hembras. Los niveles de glucosa en sangre se evaluaron en tres grupos: control + salina (control), glucosa + salina (glucosa) y glucosa + TRH (glucosa tratados con TRH). Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Para cada grupo experimental se analizaron $n = 15$ ejemplares adultos. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey (bilateral). La significancia estadística se indica como sigue: $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****); ns, no significativo. Los datos son representativos de un experimento independiente.

De manera complementaria, en un experimento independiente realizado en un grupo reducido de peces cebra machos ($n = 6$) utilizando el mismo modelo de hiperglicemia, la administración de insulina humana produjo una reducción significativa en los niveles de glucosa en sangre, disminuyendo de 79.2 ± 20.2 mg/dL en peces expuestos a glucosa a 48.3 ± 7.9 mg/dL post tratamiento con insulina (ver **Figura 21, Anexo 3**).

10.5 Expresión génica del sistema TRHérgico y del metabolismo de la glucosa por la TRH

A nivel pancreático, en los machos (**Fig. 14-A**), la hiperglicemia indujo un aumento significativo en la expresión del gen *insa* en comparación con el grupo control ($p < 0.001$; **Fig. 14-A1**), consistente con una respuesta compensatoria frente al incremento de glucosa. De manera notable, el tratamiento con la TRH redujo significativamente la expresión del gen *insa* respecto al grupo hiperglicémico ($p < 0.0001$), alcanzando niveles incluso inferiores a los observados en el control. Por su parte, la expresión del gen *trh* no mostró modificaciones significativas bajo condiciones de hiperglicemia; sin embargo, disminuyó de forma significativa después de la exposición a la TRH ($p < 0.05$; **Fig. 14-A2**). En cuanto a los componentes del sistema TRHérgico, la expresión de *trh-r1a* no mostró cambios significativos entre los grupos experimentales (**Fig. 14-A3**). En contraste, *trh-de* presentó una disminución significativa en respuesta a la hiperglicemia ($p < 0.0001$), efecto que fue revertido tras la administración de la TRH, restableciendo niveles de expresión similares a los observados en el grupo control (**Fig. 14-A4**).

En las hembras (**Fig. 14-B**), la hiperglicemia indujo también un aumento significativo en la expresión de *insa* ($p < 0.001$; **Fig. 14-B1**), el cual fue revertido por el tratamiento con la TRH, restaurando los niveles de expresión a valores similares a los del grupo control. De forma relevante, la magnitud de esta inducción fue marcadamente mayor en las hembras, con un incremento relativo de 5.0 unidades en comparación a 1.5 unidades en machos, lo que representa una respuesta de aproximadamente 3.33 veces superior. Asimismo, la hiperglicemia promovió un aumento significativo en la expresión de *trh* en hembras ($p < 0.01$; **Fig. 14-B2**), efecto que fue parcialmente revertido tras la administración de la TRH ($p < 0.05$). Sin embargo, la expresión de *trh-r1a* y *trh-de* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (**Fig. 14-B3–4**).

Páncreas

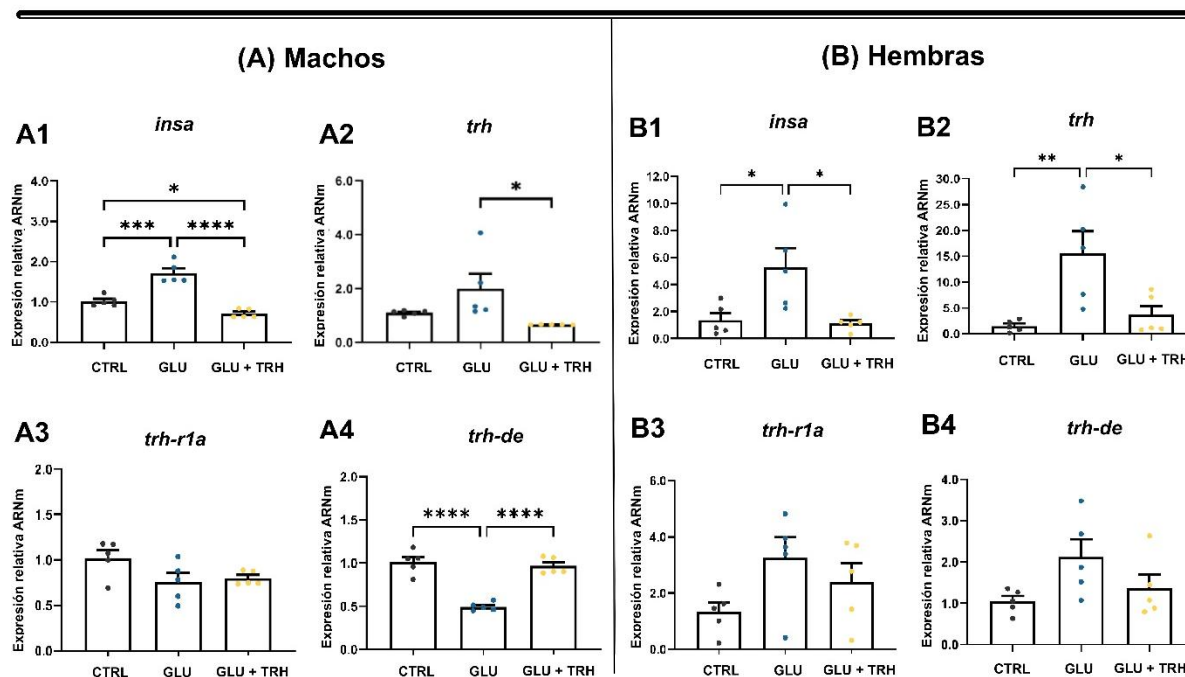


Figura 14. Expresión relativa del ARNm de la insulina y de los componentes del sistema TRHérgico en el páncreas de peces cebrá adultos machos y hembras. La expresión relativa de *insa* y de los componentes del sistema TRHérgico (*trh*, *trh-r1a* y *trh-de*) fueron cuantificadas en tejido pancreático de peces cebrá adultos bajo tres condiciones experimentales: control (inyectados con vehículo; CTRL), glucosa (hiperglicémicos, inyectados con vehículo; GLU) y glucosa + TRH (hiperglicémicos tratados con TRH a una dosis de 1 µg/g de peso corporal; GLU + TRH). Los paneles **A1–A4** corresponden a machos y los paneles **B1–B4** a hembras, ilustrando las respuestas transcripcionales dependientes del sexo para cada gen: *insa* (**A1, B1**), *trh* (**A2, B2**), *trh-r1a* (**A3, B3**) y *trh-de* (**A4, B4**). Cada réplica biológica consistió en un pool de tres páncreas por muestra. Los niveles de expresión génica fueron normalizados con respecto a β -actina y ARNr 18S, y se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) (n = 5 por grupo). Las comparaciones estadísticas entre tratamientos se realizaron dentro de cada sexo mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey (bilateral). La significancia estadística se indica como sigue: $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), y $p < 0.0001$ (****). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

A nivel hepático, en los machos (**Fig. 15-A**), la hiperglicemia no modificó significativamente la expresión de *slc2a2*, *slc2a12*, *ins-ra* ó *ins-rb* en comparación con el grupo control. No obstante, el tratamiento con la TRH disminuyó significativamente la expresión de *ins-ra* ($p < 0.01$; **Fig. 15-A3**), sin afectar los demás genes evaluados.

En las hembras (**Fig. 15-B**), la expresión de *slc2a2*, *slc2a12*, *ins-ra* e *ins-rb* se mantuvo sin cambios entre los distintos grupos experimentales.

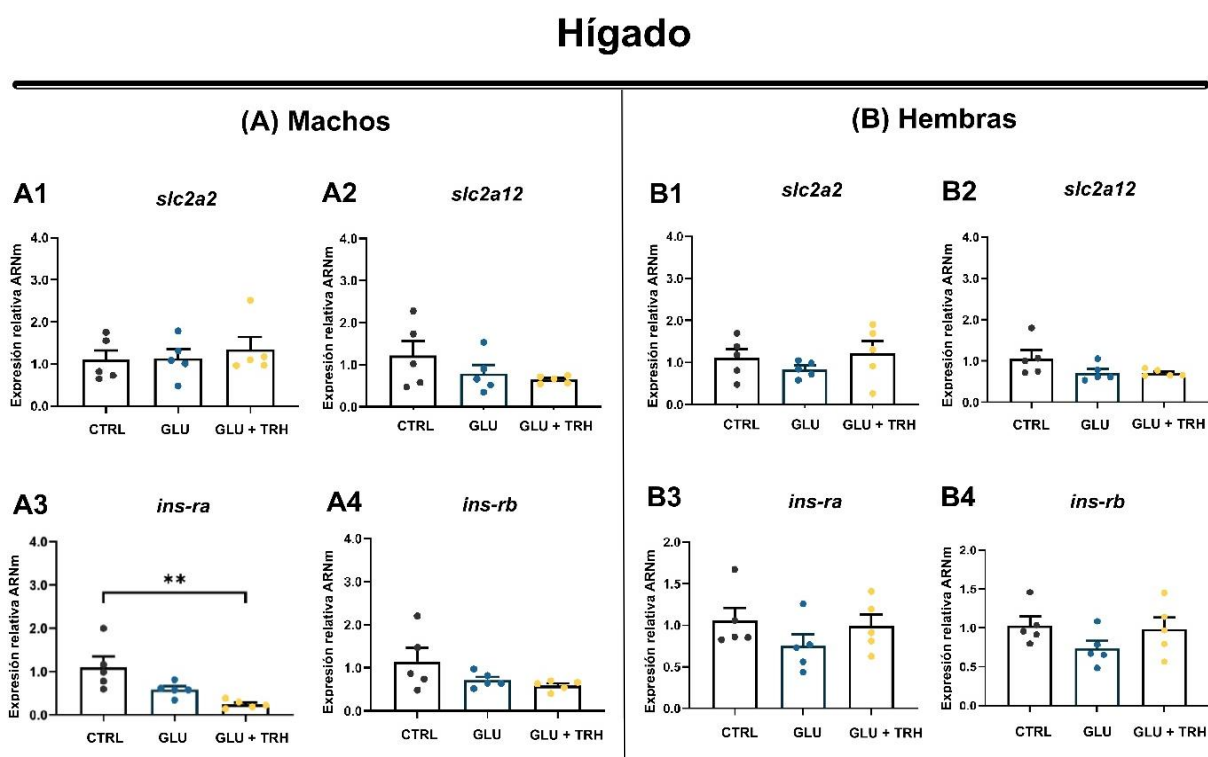


Figura 15. Expresión relativa del ARNm de los transportadores de glucosa e isoformas del receptor de insulina en el hígado de peces cebra adultos machos y hembras. La expresión relativa de los transportadores de glucosa *slc2a2* y *slc2a12*, así como de las isoformas del receptor de insulina *ins-ra* e *ins-rb*, fue cuantificada en tejido hepático de peces cebra adultos expuestos a tres condiciones experimentales: control (inyectados con vehículo; CTRL), glucosa (hiperglicémicos, inyectados con vehículo; GLU) y glucosa + TRH (hiperglicémicos tratados con TRH a una dosis de 1 µg/g de peso corporal; GLU + TRH). Los paneles **A1–A4** corresponden a machos y los paneles **B1–B4** a hembras, mostrando los patrones de expresión para *slc2a2* (**A1, B1**), *slc2a12* (**A2, B2**), *ins-ra* (**A3, B3**) e *ins-rb* (**A4, B4**). Los niveles de expresión génica fueron normalizados con respecto a β -actina

y *ARNr 18S*, y se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) ($n = 5$ por grupo). Las comparaciones estadísticas entre tratamientos se realizaron dentro de cada sexo mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey (bilateral). La significancia estadística se indica como $p < 0.01$ (**). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

En cuanto a los componentes del sistema TRHérgico en el hígado de los machos (**Fig. 16-A**), la expresión de *trh* se redujo significativamente bajo condiciones de hiperglicemia en comparación con el grupo control ($p < 0.001$; **Fig. 16-A1**). Esta disminución fue aún más pronunciada después del tratamiento con la TRH, observándose una reducción adicional respecto al grupo hiperglicémico ($p < 0.05$). Por el contrario, la expresión de *trh-r1a*, *trh-r2*, *trh-r3* y *trh-de* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales (**Fig. 16-A2–A5**).

En las hembras (**Fig. 16-B**), la expresión hepática de *trh* no presentó modificaciones significativas en respuesta a la hiperglicemia ni al tratamiento con la TRH (**Fig. 16-B1**). La isoforma *trh-r1a* fue evaluada, pero su expresión permaneció no detectable (ND) en el hígado bajo todas las condiciones experimentales (**Fig. 16-B2**), en concordancia con la caracterización basal previamente descrita. En contraste, la expresión de *trh-r2* mostró un incremento significativo con el tratamiento con la TRH en comparación con el grupo hiperglicémico ($p < 0.05$; **Fig. 16-B3**). No se observaron cambios significativos en la expresión de *trh-r3* ni de *trh-de* entre los grupos evaluados (**Fig. 16-B4–B5**).

Hígado

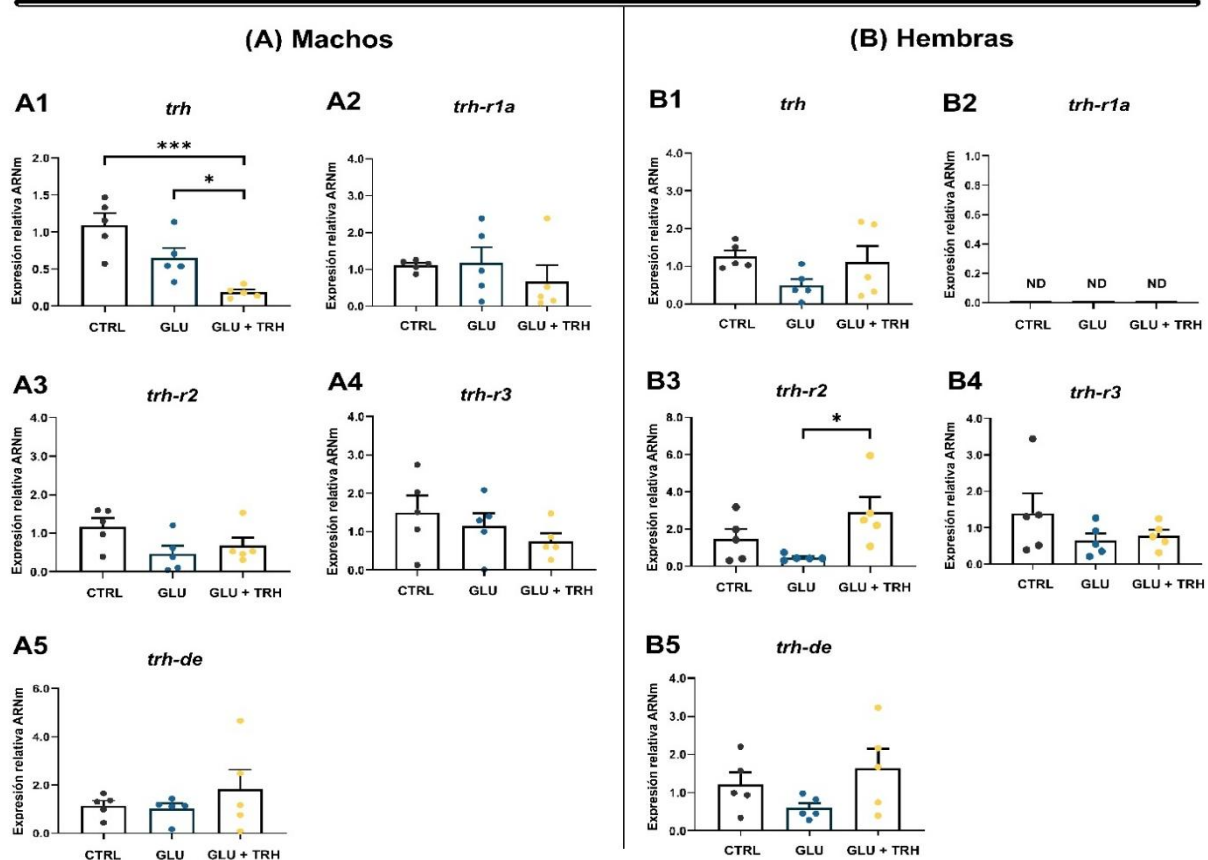


Figura 16. Expresión relativa del ARNm de los componentes del sistema TRHérgico en el hígado de peces cebrá adultos machos y hembras. La expresión hepática de *trh*, *trh-r1a*, *trh-r2*, *trh-r3* y *trh-de* fue cuantificada en tres condiciones experimentales: control (inyectados con vehículo; CTRL), glucosa (hiperglicémicos, inyectados con vehículo; GLU) y glucosa + TRH (hiperglicémicos tratados con la TRH a una dosis de 1 µg/g de peso corporal; GLU + TRH). Los paneles **A1–A5** corresponden a machos y los paneles **B1–B5** a hembras, ilustrando los patrones de expresión hepática dependientes del sexo para cada gen: *trh* (**A1**, **B1**), *trh-r1a* (**A2**, **B2**), *trh-r2* (**A3**, **B3**), *trh-r3* (**A4**, **B4**) y *trh-de* (**A5**, **B5**). En las hembras, *trh-r1a* no fue detectado (ND) en ninguno de los grupos experimentales. Cada réplica biológica consistió en una muestra individual de hígado (n = 5 por grupo). Los niveles de expresión génica fueron normalizados con respecto a β -actina y ARNr 18S, y se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre tratamientos se realizaron dentro de cada sexo mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey (bilateral). La significancia estadística se indica como sigue: $p < 0.05$ (*) y $p < 0.001$

(***). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

Finalmente, a nivel muscular, en los machos (**Fig. 17-A**) la expresión de *slc2a2* no presentó cambios significativos entre los distintos grupos experimentales (**Fig. 17-A1**). En contraste, la expresión de *slc2a12* disminuyó significativamente bajo condiciones de hiperglicemia en comparación con el grupo control ($p < 0.05$), manteniéndose reducida después del tratamiento con la TRH (**Fig. 17-A2**). Por su parte, las isoformas del receptor de insulina *ins-ra* e *ins-rb* no mostraron modificaciones significativas en respuesta a ninguno de los tratamientos evaluados (**Fig. 17-A3-A4**). En relación con *trh-de*, tanto la hiperglicemia como la administración de la TRH redujeron significativamente su expresión en comparación con el grupo control ($p < 0.001$; **Fig. 17-A5**).

En las hembras (**Fig. 17-B**), la expresión de *slc2a2*, *slc2a12*, *ins-ra*, *ins-rb* y *trh-de* no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos experimentales (**Fig. 17-B1-B5**).

Músculo

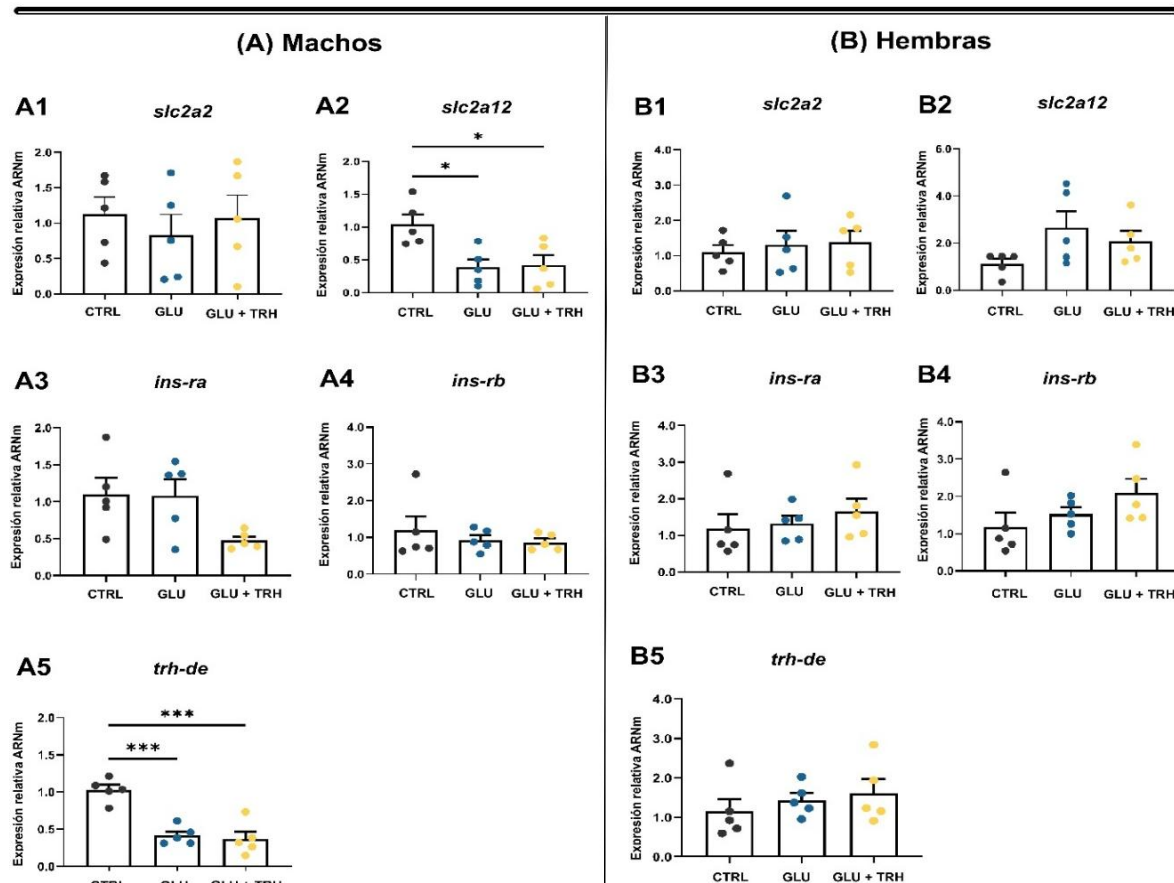


Figura 17. Expresión relativa de ARNm de genes del metabolismo glicémico y de *trh-de* en el músculo de peces cebra adultos machos y hembras. La expresión relativa de los transportadores de glucosa *slc2a2* y *slc2a12*, de las isoformas del receptor de insulina *ins-ra* e *ins-rb*, así como del gen *trh-de*, fue cuantificada en tres condiciones experimentales: control (inyectados con vehículo; CTRL), glucosa (hiperglicémicos, inyectados con vehículo; GLU) y glucosa + TRH (hiperglicémicos, tratados con la TRH a una dosis de 1 µg/g de peso corporal; GLU + TRH). Los paneles **A1–A5** corresponden a machos y los paneles **B1–B5** a hembras, mostrando los patrones de expresión dependientes del sexo para cada gen: *slc2a2* (**A1, B1**), *slc2a12* (**A2, B2**), *ins-ra* (**A3, B3**), *ins-rb* (**A4, B4**) y *trh-de* (**A5, B5**). Cada réplica biológica consistió en una muestra individual de músculo (n = 5 por grupo). Los niveles de expresión génica fueron normalizados con respecto a los genes de referencia *β-actina* y *ARNr 18S*, y los datos se presentan como media ± error estándar de la media (SEM). Las comparaciones estadísticas entre tratamientos se realizaron dentro de cada sexo mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey (bilateral). Las diferencias estadísticamente significativas se indican como: $p < 0.05$ (*), $p < 0.001$ (***). Los datos son representativos de un experimento independiente con réplicas biológicas.

10. Discusión

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un neuropéptido altamente conservado que regula funciones endocrinas, metabólicas y conductuales en vertebrados (Alvarez-Salas et al., 2022; Joseph-Bravo et al., 2015; Lechan & Fekete, 2006; Vargas et al., 2024). En este contexto, los componentes del sistema de señalización TRHérgico (el péptido TRH, sus receptores (TRH-Rs) y la enzima degradadora de TRH (TRH-DE)) han conservado regiones estructurales clave que confieren funcionalidad, reflejando un alto grado de conservación a lo largo de la evolución (Galas et al., 2009; Lazcano et al., 2021; Lazcano et al., 2025). Sin embargo, en teleósteos como el pez cebra (*Danio rerio*), la caracterización integral de este sistema aún no se ha estudiado en su totalidad. En este sentido, el presente trabajo aporta un análisis integrativo del sistema TRHérgico desde una perspectiva filogenética, transcripcional y funcional, explorando su conservación evolutiva, su expresión tisular y su posible participación en funciones periféricas, particularmente en la regulación del metabolismo de la glucosa.

10.1 Conservación evolutiva e integridad estructural del sistema TRHérgico en el pez cebra

Los análisis filogenéticos y de secuencias revelaron una alta conservación del péptido precursor de la TRH (pre proTRH) en el pez cebra, destacando la preservación del motivo funcional Glu-His-Pro-Gly (QHPG), esencial para su actividad biológica. De manera interesante, se identificó un mayor número de copias de este motivo en comparación con humanos, ratas y aves, un patrón que coincide con lo observado en otras especies de peces como *Oncorhynchus nerka*, *Carassius auratus* y *Oryzias latipes* (Wallis, 2010; Feng et al., 2022). Esta expansión del número de copias del motivo QHPG podría reflejar una aparente estrategia evolutiva para diversificar la señalización TRHérgica en peces, posiblemente permitiendo una modulación más fina o prolongada de sus efectos fisiológicos.

Asimismo, se identificaron cuatro isoformas de receptores de la TRH (TRH-R1a, TRH-R1b, TRH-R2 y TRH-R3), resultado de duplicaciones génicas características del linaje de los teleósteos (Mekuchi et al., 2011; Saito et al., 2011). A diferencia de los mamíferos, en los que predominan principalmente el TRH-R1 y TRH-R2, los peces presentan una mayor diversidad de receptores, lo que sugiere una posible necesidad evolutiva de diferenciación funcional entre tejidos. Esta diversidad podría estar asociada con la participación de la TRH en procesos fisiológicos más amplios, como la función neuronal, la regulación metabólica, el comportamiento alimentario, la osmorregulación y la respuesta al estrés, todos ellos procesos particularmente relevantes en organismos acuáticos (Lazcano et al., 2023; Rotllant et al., 2000; Singh et al., 2019; van de Pol et al., 2017).

La expresión de la TRH y de sus receptores tanto en regiones hipotalámicas como extrahipotalámicas refuerza la idea de que el sistema TRHérgico en peces ha evolucionado más allá de su papel clásico en el eje HHT. Estudios previos han demostrado la presencia de la TRH en múltiples regiones del SNC y en tejidos periféricos, apoyando una diversificación funcional del sistema adaptada a las demandas fisiológicas específicas de los teleósteos (Blanco, 2020; Bu et al., 2025; Díaz et al., 2002). Esta expansión funcional podría representar una adaptación evolutiva que permite integrar señales ambientales, metabólicas y neuroendocrinas de manera más eficiente en organismos ectotermos.

Por otro lado, la enzima TRH-DE mostró una clara conservación de sus dominios funcionales en el pez cebra, lo que sugiere que mantiene su función reguladora en la señalización TRHérgica. La preservación de esta enzima indica que, a pesar de la expansión del número de receptores y de la posible diversificación funcional del sistema, el control de los niveles locales de la TRH mediante degradación enzimática sigue siendo un mecanismo crítico para la homeostasis del sistema. En conjunto, estos hallazgos refuerzan la noción de que el sistema TRHérgico en el pez cebra es evolutivamente conservado y algunos de sus elementos se expresan más allá de sus sitios canónicos, sugiriendo funciones puntuales que pueden apoyar la interpretación de sus roles ontogénicos, tisulares y metabólicos descritos en los apartados subsecuentes de esta discusión.

10.2 Expresión ontogénica de los genes del sistema TRHérgico durante el desarrollo temprano

El análisis ontogénico reveló que los genes del sistema TRHérgico aumentan progresivamente su expresión entre el día 1 y 5 días post-fertilización, lo que sugiere una activación cigótica del sistema y ausencia de transcritos de origen materno. Este patrón indica que la señalización TRHérgica podría integrarse tempranamente a los procesos de desarrollo embrionario. En mamíferos, se ha propuesto que la expresión temprana de la TRH participa no solo en la organización del SNC, sino también en la diferenciación y maduración del páncreas fetal (Basmaciogullari et al., 2000; Luo & Yano, 2004). Aunque estas funciones no han sido exploradas en peces, los resultados obtenidos abren la posibilidad de que el sistema TRHérgico desempeñe roles análogos durante el desarrollo temprano del pez cebra.

En este mismo sentido, la expresión del gen de la *trh* aumentó progresivamente hasta el 4 dpf, coincidiendo con la maduración del SNC y la activación de ejes neuroendocrinos (Lazcano et al., 2023). A diferencia de los mamíferos, en peces, la TRH no regula directamente el eje HHT; sin embargo, se ha demostrado que puede inducir la liberación de hormona de crecimiento (GH) y hormona estimuladora de

melanocitos alfa (α -MSH), lo que sugiere su participación en otros ejes neuroendocrinos durante el desarrollo (Galas et al., 2009; Lazcano et al., 2025). Entre los receptores, *trh-r1b* mostró un pico de expresión particularmente marcado, apoyando la hipótesis de que esta isoforma desempeña un papel dominante en la señalización temprana de la TRH. Este hallazgo concuerda con estudios previos en pez cebra y *Pimephales promelas* que reportan una expresión temprana de este receptor (Vergauwen et al., 2018). En contraste, *trh-r3* presentó un aumento transitorio, mientras que *trh-r1a* y *trh-r2* permanecieron en niveles bajos. Cabe destacar que se ha descrito que el *trh-r1a* presenta una expresión específica en la glándula de eclosión a los 2 dpf, y que su activación por la TRH es necesaria para la ruptura del corion, lo que evidencia un papel funcional específico de esta isoforma durante el desarrollo temprano del pez cebra (Gajbhiye et al., 2024). Cabe mencionar que la baja expresión detectada para algunas isoformas en este estudio podría atribuirse a la cuantificación global realizada en embriones completos, lo que sugiere que funciones altamente específicas de ciertos receptores pueden quedar enmascaradas cuando se analizan organismos completos, enfatizando así la necesidad de futuros estudios con mayor resolución tisular o incluso a nivel celular. Por su parte, la expresión baja y constante del *trh-de* durante el desarrollo sugiere una degradación controlada de la TRH, favoreciendo señales prolongadas durante etapas críticas del desarrollo.

10.3 Distribución central y periférica de los componentes TRHérgicos en el pez cebra adulto

En peces adultos, los componentes del sistema TRHérgico se detectaron tanto en el SNC como en múltiples tejidos periféricos. La alta expresión en el cerebro concuerda con estudios en otros teleósteos que describen una amplia inmunoreactividad de la TRH en regiones como el hipotálamo, el área preóptica, el telencéfalo, el mesencéfalo y el tallo cerebral (Batten et al., 1990; Buckley et al., 2010; Bu et al., 2025; Díaz et al., 2002). Esta distribución apoya un posible papel neuromodulador central en la integración sensorial, el control motor y la regulación del comportamiento alimentario y locomotor (Abbott & Volkoff, 2011; Rotllant et al., 2000; Singh et al., 2019; Vargas et al., 2024; van de Pol et al., 2017).

De manera notable, la retina mostró expresiones más altas de los elementos del sistema TRHérgico después del cerebro, tanto en machos como en hembras. Este hallazgo es consistente con la evidencia acumulada en vertebrados que demuestra la presencia de la TRH y de sus receptores en tejidos retinianos (Lazcano et al., 2024). En teleósteos y anfibios, la inmunoreactividad de la TRH también se ha localizado en células amacrinas (Anadón et al., 2002; Díaz et al., 2002), mientras que en humanos se ha detectado la TRH y TRH-R en toda la retina (Dubovy et al.,

2017; Martino et al., 1980). Estudios recientes de transcriptómica de célula única han identificado componentes del sistema TRHérgico en bastones, células amacrinas y astrocitos, sugiriendo funciones complejas en la comunicación neuronal de la retina (Yan et al., 2020). En conjunto, estos resultados posicionan al pez cebra como un modelo atractivo para explorar el papel de neuropéptidos en la fisiología visual.

Más allá del SNC, la expresión de *trh*, sus receptores y *trh-de* en tejidos periféricos como el hígado, el páncreas, la piel, el corazón y el tracto gastrointestinal sugiere la existencia de mecanismos de señalización autocrinos y/o paracrinos en estos órganos. En mamíferos, la TRH ha sido implicada en la regulación de la secreción de insulina, la motilidad gastrointestinal, la actividad secretora gástrica y el metabolismo energético (Fekete & Lechan, 2014; Lechan & Fekete, 2006; Luo et al., 2014; Morley et al., 1977; Taché et al., 2006; Zhang et al., 2018). De manera concordante, estudios recientes en teleósteos han confirmado la expresión periférica de preproTRH y de sus receptores en músculo, piel, intestino, riñón e hígado (Blanco, 2020; Bu et al., 2025; Feng et al., 2022), reforzando la noción de que se trata de un sistema funcionalmente activo fuera del SNC y conservado evolutivamente en vertebrados.

De manera particularmente interesante, nuestro análisis reveló una expresión relativamente elevada de *trh* en el hígado, especialmente en machos. Aunque el hígado no se considera un sitio característico de expresión de la TRH en mamíferos, donde predominan la detección de TRH-Rs y TRH-DE (Charli et al., 2020; Mitsuma et al., 1995; Vargas et al., 2024), la expresión hepática de la TRH ha sido reportada en vertebrados no mamíferos, incluidos teleósteos (Feng et al., 2022; Ruiz-Jarabo et al., 2018) y reptiles (Ávila-Mendoza et al., 2018). En estos modelos, la expresión hepática de la TRH ha sido interpretada como soporte de señalización local autocrina o paracrina más que de las acciones endocrinas clásicas. La detección simultánea de *trh-rs* y *trh-de* en el hígado del pez cebra sugiere que este tejido podría integrar la señalización TRHérgica de manera dependiente del estado fisiológico, contribuyendo potencialmente a la regulación metabólica local.

En este mismo contexto metabólico, la presencia de *trh* en el páncreas adquiere especial relevancia. Análisis transcriptómicos previos en pez cebra han reportado la expresión de *trh* en células β pancreáticas (Tarifeño-Saldivia et al., 2017). En mamíferos, tanto la expresión como la señalización de la TRH han sido documentadas en células β (Basmaciogullari et al., 2000; Luo & Yano, 2004; Mulla et al., 2009), donde la TRH participa en la regulación hormonal y en la maduración y diferenciación de los islotes pancreáticos (Amir, 1988; Luo & Yano, 2004; Luo et al., 2008; Luo et al., 2014; Štrbák, 2018). En conjunto, estos antecedentes resaltan la posibilidad de que la TRH producida localmente influya en la fisiología de la célula

β en el pez cebra, apoyando un papel periférico conservado en la homeostasis energética.

La piel también fue considerada un tejido de interés debido a su reconocido papel como órgano neuroendocrino especializado en vertebrados (Slominski & Wortsman, 2000). En anfibios como *Rana pipiens*, la TRH es altamente abundante en la piel y ha sido propuesta como un reservorio periférico mayor, localizándose en glándulas granulares dérmicas y liberándose activamente en respuesta a estimulación adrenérgica, lo que sugiere funciones en osmorregulación y adaptación ambiental (Bennett et al., 1981; Jackson & Reichlin, 1977). En humanos, la TRH y su receptor han sido detectados en folículos pilosos, donde ejercen efectos funcionales directos estimulando el crecimiento del cabello, prolongando la fase anágena y reduciendo la apoptosis de las células de la matriz folicular (Gáspár et al., 2010). Aunque la presencia de la TRH en la piel de teleósteos ha sido previamente reportada (Ruiz-Jarabo et al., 2018), la evidencia funcional aún es limitada; no obstante, la detección de componentes TRHérgicos en este tejido sugiere posibles roles neuroendocrinos periféricos que merecen mayor investigación.

Finalmente, la amplia expresión de *trh-de* en tejidos centrales y periféricos sugiere que la disponibilidad local de la TRH podría estar finamente regulada mediante degradación enzimática. En mamíferos se ha descrito una isoforma hepática soluble de TRH-DE que participa en la inactivación de la TRH circulante (Charli et al., 2020; Fröhlich & Wahl, 2019; Schmitmeier et al., 2002). En el presente estudio no fue posible evaluar la actividad enzimática de TRH-DE sobre la TRH circulante debido a la limitación en la obtención de muestras séricas en pez cebra, lo cual representa una línea relevante para investigaciones futuras orientadas a dilucidar el papel sistémico de esta enzima.

10.4 Dimorfismo sexual en el sistema TRHérgico

El dimorfismo sexual constituye una fuente importante de variabilidad fisiológica en peces y puede influir de manera significativa en la regulación endócrina y metabólica (Campbell et al., 2021; Li et al., 2024; Zhou et al., 2021). En el pez cebra, se han descrito patrones sexo-específicos bien definidos, que indican que machos y hembras adoptan estrategias fisiológicas y metabólicas diferenciadas. Análisis transcriptómicos en tejidos metabólicamente activos, como el hígado y el corazón, han reportado consistentemente una mayor expresión de factores de transcripción asociados al metabolismo energético en machos, lo que respalda un perfil metabólico caracterizado por mayor actividad energética (Abu Nahia et al., 2024; Robison et al., 2008; Zheng et al., 2013). De manera concordante, los machos presentan una activación más robusta del eje del estrés y una mayor movilización

energética dependiente del cortisol, traduciéndose en respuestas metabólicas más rápidas ante desafíos ambientales (Goikoetxea et al., 2017). A nivel fisiológico, se ha descrito que los machos muestran una tasa metabólica basal más elevada durante etapas juveniles (~3 meses), la cual posteriormente disminuye por debajo de la de las hembras en edades avanzadas (≥ 1 año) (Konadu et al., 2023). En contraste, las hembras presentan un metabolismo lipídico más activo, una mayor tendencia al almacenamiento energético, incremento en la síntesis proteica y crecimiento celular (Robison et al., 2008), además de una mayor sensibilidad a estímulos sensoriales y una integración neuroendocrina más eficiente (Genario et al., 2020; Gorissen & Flik, 2016). Este contexto fisiológico sugiere que los sistemas neuroendocrinos podrían modularse diferencialmente entre sexos en función de demandas energéticas.

En este marco, nuestros resultados evidencian una regulación sexo-dependiente del sistema TRHérgico en el pez cebra adulto. En los machos, la mayor expresión hepática de *trh* y la mayor expresión de *trh-r1a* en el corazón se alinean parcialmente con la evidencia transcriptómica que indica una mayor activación de programas génicos relacionados con metabolismo y gasto energético en estos tejidos. La presencia enriquecida de *trh* en el hígado sugiere un posible papel local en la modulación metabólica, mientras que la mayor expresión de *trh-r1a* en el corazón podría indicar un sitio específico de acción de la TRH en este órgano. En modelos mamíferos, se ha documentado evidencia funcional que respalda un papel de la TRH en el corazón (Peres Díaz et al., 2018), lo que sugiere que esta función podría estar conservada evolutivamente. Además, el rango de edad de los organismos analizados en este estudio (3–12 meses) coincide parcialmente con la etapa juvenil en la que se ha reportado una mayor tasa metabólica basal en machos (Konadu et al., 2023), lo que podría contribuir a explicar las diferencias observadas.

Por otro lado, las hembras exhibieron características diferenciales dentro del sistema TRHérgico, incluyendo mayor expresión de *trh-r3* en el tracto GI y una expresión consistentemente elevada de *trh-de* en múltiples tejidos. El incremento en la expresión de *trh-de* sugiere un control más estrecho de la disponibilidad local de la TRH en hembras, posiblemente reflejando una regulación más fina de la señalización neuroendocrina. Estas características podrían estar asociadas con procesos de manejo energético, mantenimiento tisular y fisiología reproductiva. La presencia de la TRH y/o de sus receptores en el tracto GI ha sido documentada en diversas especies de teleósteos, incluyendo medaka (Mekuchi et al., 2011), tilapia (Bu et al., 2025), el lenguado (Buckley et al., 2010) y la anguila (Feng et al., 2022), aunque sin una evaluación explícita de diferencias sexo-específicas. En mamíferos, la TRH en el tracto GI ha sido propuesta como un regulador local de la motilidad y de la secreción hormonal (Morley et al., 1977), lo que sugiere que funciones periféricas similares podrían estar presentes en teleósteos.

10.5 Respuesta hipoglicemiante dependiente del sexo a la TRH bajo condiciones de desafío metabólico

En el modelo de hiperglicemia empleado, la administración de la TRH redujo significativamente los niveles de glucosa circulante exclusivamente en machos adultos, lo que demuestra que la TRH es bioactiva bajo condiciones de desafío metabólico y que su efecto es dependiente del sexo. Este hallazgo respalda la hipótesis de que la señalización TRHérgica puede participar activamente en la modulación del metabolismo glucémico en teleósteos.

Nuestros resultados son consistentes con evidencia en mamíferos que vincula la señalización de la TRH con el control de la glucosa. La deficiencia de la TRH o de su receptor se asocia con alteraciones glicémicas, incluyendo hiperglicemia (Yamada et al., 1997; Zeng et al., 2007). Además, diversos estudios han documentado respuestas sexo-dependientes a la TRH en modelos de disfunción metabólica. Ao et al. (2005) demostraron que la administración central del análogo RX 77368 produjo respuestas diferenciales en ratas Goto–Kakizaki, induciendo hiperglicemia con marcada hiperinsulinemia en machos, mientras que en hembras generó un efecto hipoglicemiante con actividad insulínica moderada. De forma similar, Bačová et al. (2005) reportaron que la exposición neonatal a la TRH en ratas tratadas con estreptozotocina provocó alteraciones endocrinas pancreáticas a largo plazo con efectos diferenciados sobre los niveles de glicemia dependientes del sexo. En conjunto, estos antecedentes respaldan el dimorfismo sexual de la acción metabólica de la TRH.

La ausencia de un efecto hipoglicemiante en hembras en nuestro modelo podría explicarse por diferencias en la expresión de los componentes TRHérgicos, en la sensibilidad tisular o en la biodisponibilidad del péptido. En particular, la mayor expresión periférica de *trh-de* observada en hembras sugiere un control más estricto de la disponibilidad local de TRH mediante degradación enzimática, lo que podría limitar su eficacia sistémica.

Dado que en teleósteos el eje HHT participa en la adaptación osmótica e interactúa con cortisol, GH y prolactina (Deal and Volkoff, 2020), era pertinente considerar una posible contribución del estrés osmótico derivado del modelo de inmersión en glucosa. Sin embargo, la evidencia indica que la hiperglicemia inducida por este modelo es predominantemente metabólica y no osmótica. McCarthy et al. (2021) y Tanvir et al. (2018) demostraron que la exposición a glucosa incrementa la glicemia, mientras que controles osmóticos con manitol no reproducen este efecto. Además, la osmolaridad ambiental generada por 111 mM de glucosa (~115–125 mOsm/kg) permanece muy por debajo de la osmolaridad plasmática del pez cebra (~280–330 mOsm/kg; Lawrence, 2007; Kozłowski et al., 2017), manteniendo un medio externo hipotónico. No obstante, considerando la sensibilidad de la señalización TRHérgica

a estímulos metabólicos y neuroendocrinos, no se puede excluir completamente una interacción secundaria con señales de estrés. En este contexto, la ausencia de la respuesta hipoglicemiante en hembras podría reflejar una integración sexo-específica entre el estado metabólico y la regulación neuroendocrina.

10.6 Regulación transcripcional asociada a la modulación metabólica mediada por la TRH

El análisis molecular del páncreas, el hígado y el músculo permitió profundizar en los mecanismos subyacentes al efecto hipoglicemiante observado. Nuestros hallazgos indican que la TRH participa en la regulación de la homeostasis glicémica en el pez cebra, independientemente de un efecto insulínico directo.

En el páncreas, la hiperglicemia indujo un aumento robusto en la expresión del gen *insa* en ambos sexos, consistente con una respuesta compensatoria previamente descrita en este modelo (Nipu et al., 2022). Sin embargo, el tratamiento con la TRH no incrementó la expresión de *insa*; por el contrario, normalizó su sobreexpresión en hembras y la redujo por debajo de los niveles basales en machos. Estos datos sugieren que el efecto hipoglicemiante de la TRH no depende de una estimulación sostenida de la transcripción de la insulina, sino que podría reducir incluso la necesidad de su activación prolongada.

Esta interpretación es consistente con estudios en mamíferos que demuestran que la TRH no estimula la secreción de insulina bajo condiciones fisiológicas estables, sino que actúa principalmente cuando la función de la célula β se encuentra alterada (Najvirtová et al., 2005; Luo et al., 2008; Štrbák, 2018). Así, más que actuar como un secretagogo directo, la TRH podría desempeñar un papel modulador, preservando la integridad funcional de las células β bajo condiciones de estrés metabólico. No obstante, debe considerarse que los efectos de la TRH sobre la secreción de la insulina pueden ser transitorios. En nuestro diseño experimental, la evaluación se realizó tres días después del tratamiento inicial de glucosa, por lo que efectos tempranos y de corta duración sobre la expresión o secreción de insulina podrían no haber sido detectados.

A nivel pancreático, la TRH moduló la expresión de componentes de su propio sistema de señalización de manera dependiente del sexo. En machos, la hiperglicemia redujo la expresión de *trh-de*, mientras que el tratamiento con la TRH la restauró a niveles basales; asimismo, la administración de la TRH disminuyó la expresión de *trh*. En hembras, la hiperglicemia incrementó significativamente la expresión de *trh*, efecto que fue atenuado por la administración de la TRH. En este contexto, la activación del sistema TRHérgico bajo condiciones de demanda metabólica sugiere su participación en mecanismos locales de regulación

pancreática orientados a preservar la integridad funcional del tejido ante estrés celular. Además, estos patrones se alinean con procesos de autorregulación tisular, dado que la TRH ha demostrado modular la expresión de sus propios componentes de señalización (Cook and Hinkle, 2004; Harris et al., 2001; Heuer et al., 1998; Pech-Pool et al., 2020).

En el hígado, los resultados refuerzan la idea de que la TRH actúa como modulador endocrino-metabólico más que como factor insulínico. En machos, la hiperglicemia redujo la expresión hepática de *trh*, y esta disminución se acentuó después del tratamiento con la TRH, sugiriendo la activación de mecanismos homeostáticos locales que atenúan el tono TRHérgico en condiciones de elevada demanda energética. Este fenómeno podría limitar la activación excesiva de rutas metabólicas asociadas con estrés celular, lipogénesis o desequilibrio energético, previamente descritas en pez cebra bajo activación sostenida de ejes neuroendocrinos (Faught and Vijayan, 2019; Nipu et al., 2022; Ruiz-Jarabo et al., 2018). De manera notable, la sobreexpresión del receptor *trh-r2* en el hígado de hembras sugiere la activación de vías TRHérgicas dependientes del sexo involucradas en la regulación metabólico-endocrina, las cuales merecen una investigación más profunda para esclarecer su papel funcional específico.

Además, la hiperglicemia sostenida junto con el tratamiento de la TRH promovió en el hígado y en el músculo una disminución en la expresión de genes asociados a la señalización de insulina, como *slc2a12* e *ins-ra*, patrón previamente descrito en contextos de hiperglicemia crónica e hiperinsulinemia como un mecanismo adaptativo destinado a proteger a las células de la glucotoxicidad (Dos Santos et al., 2020; Tokarz et al., 2018). Factores de transcripción como *foxo1* y *srebp1c* han sido implicados en la regulación negativa de genes relacionados con el metabolismo de la glucosa en respuesta a incrementos sostenidos de glucosa intracelular (Bi et al., 2014; Shimomura et al., 2000), y estas vías están presentes y funcionales en el pez cebra (Gong et al., 2018; Pan et al., 2019). Aunque su participación específica no fue evaluada en este estudio, los patrones observados son consistentes con la activación de programas compensatorios destinados a preservar la homeostasis energética.

Desde una perspectiva integradora, nuestros datos sugieren que la TRH podría modular la glicemia mediante mecanismos independientes a la estimulación directa de la insulina, potencialmente involucrando regulación autonómica central, modulación de la producción hepática de glucosa o interacción con hormonas contrarreguladoras como el glucagón (Fekete y Lechan, 2014; Joseph-Bravo et al., 2015). Este efecto fue particularmente evidente en machos, quienes exhibieron un perfil metabólico más favorable después de la administración de la TRH.

En conjunto, los resultados posicionan a la TRH como una hormona moduladora que ajusta finamente las respuestas metabólicas y contribuye a la preservación de la homeostasis celular bajo condiciones de estrés metabólico. Más que activar directamente vías insulínótropas, la TRH parece funcionar como un regulador integrador que coordina respuestas tisulares de manera dependiente del sexo y del órgano. Asimismo, estos hallazgos consolidan al pez cebra como un modelo valioso para investigar las acciones metabólicas sexo-dependientes de la TRH tanto a nivel periférico como central.

10.7 Alcances y perspectivas del estudio

Aunque este estudio proporciona una caracterización integral del sistema TRHérgico en el pez cebra y muestra su participación en la regulación del metabolismo glicémico, es importante reconocer algunas limitaciones y perspectivas. El análisis funcional se centró en la expresión génica, sin evaluar de manera directa los cambios a nivel proteico ni las modificaciones postraduccionales, aspectos fundamentales para confirmar la relevancia funcional de los hallazgos.

Asimismo, no se exploraron de forma directa las vías de señalización intracelular potencialmente implicadas. En el páncreas, habría sido relevante analizar la activación de factores como CREB y la dinámica del calcio intracelular, mientras que en las vías dependientes de insulina la evaluación de efectores como AKT o IRS-1 habría fortalecido la interpretación mecanística. La identificación precisa de las rutas responsables del efecto hipoglicemiante inducido por la TRH constituye, por tanto, un paso necesario en investigaciones futuras.

Por otro lado, los resultados abren diversas líneas de investigación. El uso de herramientas genéticas disponibles en el pez cebra, como modelos transgénicos y edición génica mediante CRISPR/Cas9, permitirá abordar con mayor resolución el papel tejido-específico del sistema TRHérgico en páncreas, hígado y músculo. Finalmente, el marcado dimorfismo sexual observado posiciona a este modelo como una plataforma idónea para estudiar la interacción entre hormonas sexuales y sistemas peptidérgicos en la regulación metabólica, con implicaciones potenciales para el entendimiento sexo-específico de enfermedades como la diabetes mellitus.

11. Conclusiones

En conjunto, los resultados de este estudio demuestran que los componentes del sistema TRHérgico en el pez cebra presentan una organización molecular conservada y potencialmente funcional, cuya acción no se restringe al nivel central como regulador neuroendocrino, sino que se extiende hacia la modulación periférica del metabolismo glicémico. Mediante un enfoque integrador que combinó análisis bioinformáticos, evaluación ontogenética, caracterización de la expresión génica en tejidos centrales y periféricos, así como experimentos *in vivo* bajo condiciones de hiperglicemia, se generó evidencia consistente de que la TRH podría participar activamente en el mantenimiento de la homeostasis metabólica, y se sugiere también, implicación de sus componentes asociados.

El análisis filogenético y comparativo reveló un alto grado de conservación estructural entre los componentes del sistema TRHérgico del pez cebra y sus homólogos en otros vertebrados, lo que respalda su relevancia evolutiva. Asimismo, la detección temprana de los transcritos de *trh*, sus receptores y la enzima degradadora durante el desarrollo embrionario sugiere que este sistema podría desempeñar funciones no solo neuroendocrinas, sino también asociadas a procesos de maduración tisular e integración entre sistemas centrales y periféricos.

En organismos adultos, la caracterización tisular evidenció una amplia distribución del sistema TRHérgico tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos clave para el metabolismo energético, incluyendo páncreas, hígado y músculo. De manera relevante, se identificó un dimorfismo sexual en la expresión basal y en la respuesta ante la hiperglicemia y el tratamiento con la TRH. Los machos mostraron mayor sensibilidad metabólica en hígado y músculo, mientras que las hembras presentaron mayor sensibilidad transcripcional en páncreas y mayor abundancia basal de receptores y *trh-de* en tejidos periféricos, lo que sugiere mecanismos regulatorios diferenciados entre sexos.

Aunque no se observó un efecto insulíntrópico directo bajo las condiciones evaluadas, los hallazgos apoyan la hipótesis de que la TRH actúa como modulador hormonal local en tejidos metabólicamente activos, ajustando la respuesta transcripcional y funcional frente a estados de desregulación glicémica.

En conjunto, estos resultados permiten proponer que la TRH ejerce funciones de control local, tejido-específicas y sexo-dependientes, contribuyendo de manera integral al mantenimiento de la homeostasis glicémica tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

12. Referencias bibliográficas

1. Abbott, M., & Volkoff, H. (2011). Thyrotropin releasing hormone (TRH) in goldfish (*Carassius auratus*): Role in the regulation of feeding and locomotor behaviors and interactions with the orexin system and cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). *Hormones and Behavior*, 59(2), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.12.008>
2. Abu Nahia, K., Sulej, A., Migdał, M., Ochocka, N., Ho, R., Kamińska, B., Zagorski, M., & Winata, C. L. (2024). scRNA-seq reveals the diversity of the developing cardiac cell lineage and molecular players in heart rhythm regulation. *iScience*, 27(6), 110083. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110083>
3. Alvarez-Salas, E., García-Luna, C., Soberanes-Chávez, P., & de Gortari, P. (2022). Role of the thyrotropin-releasing hormone of the limbic system in mood and eating regulation. *Journal of Integrative Neuroscience*, 21(2), 47. <https://doi.org/10.31083/j.jin2102047>
4. American Diabetes Association. (2025). Standards of care in diabetes—2025. *Diabetes Care*, 48(Suppl. 1), S1–S200. <https://doi.org/10.2337/dc25-S001>
5. American Fisheries Society, American Society of Ichthyologists and Herpetologists, & American Institute of Fishery Research Biologists. (2014). *Guidelines for the use of fishes in research*. American Fisheries Society.
6. Amir, S. (1988). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) blocks glucagon-induced hyperglycemia in mice: Dissociation of the antihyperglycemic and pituitary actions of TRH. *Brain Research*, 455(1), 201–203. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(88\)90135-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(88)90135-7)
7. Anadón, R., Díaz, M. L., Becerra, M., & Manso, M. J. (2002). Presence of thyrotropin-releasing-hormone-immunoreactive (TRHir) amacrine cells in the retina of anuran and urodele amphibians. *Brain Research*, 926(1–2), 86–93. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03307-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03307-8)
8. Antonio-Villa, N. E., Bello-Chavolla, O. Y., Fermín-Martínez, C. A., Ramírez-García, D., Vargas-Vázquez, A., Basile-Alvarez, M. R., Núñez-Luna, A., Sánchez-Castro, P., Fernández-Chirino, L., Díaz-Sánchez, J. P., Dávila-López, G., Posadas-Sánchez, R., Vargas-Alarcón, G., Caballero, A. E., Florez, J. C., & Seiglie, J. A. (2024). Diabetes subgroups and sociodemographic inequalities in Mexico: A cross-sectional analysis of nationally representative surveys from 2016 to 2022. *The Lancet Regional Health – Americas*, 33, 100732. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100732>
9. Ao, Y., Toy, N., Song, M. K., Go, V. L., & Yang, H. (2005). Altered glucose and insulin responses to brain medullary thyrotropin-releasing hormone

- (TRH)-induced autonomic activation in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology*, 146(12), 5425–5432. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0553>
10. Ávila-Mendoza, J., Pérez-Rueda, E., Urban-Sosa, V., Carranza, M., Martínez-Moreno, C. G., Luna, M., & Arámburo, C. (2018). Characterization and distribution of GHRH, PACAP, TRH, SST and IGF1 mRNAs in the green iguana. *General and Comparative Endocrinology*, 255, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.09.027>
 11. Bacová, Z., Baqi, L., Beňačka, O., Payer, J., Križanová, O., Zeman, M., Smreková, L., Zorad, Š., & Štrbák, V. (2006). Thyrotropin-releasing hormone in rat heart: Effect of swelling, angiotensin II and renin gene. *Acta Physiologica*, 187(1–2), 313–319. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2006.01545.x>
 12. Bacová, Z., Najvirtová, M., Križanová, O., Hudecová, S., Zórad, Š., Štrbák, V., & Benický, J. (2005). Effect of neonatal streptozotocin and thyrotropin-releasing hormone treatments on insulin secretion in adult rats. *General Physiology and Biophysics*, 24(2), 181–197.
 13. Banday, M. Z., Sameer, A. S., & Nissar, S. (2020). Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna Journal of Medicine*, 10(4), 174–188. https://doi.org/10.4103/ajm.ajm_53_20
 14. Banerji, A., & Prasad, C. (1982). The postnatal development of the pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor in male and female rats. *Endocrinology*, 110(2), 663–664. <https://doi.org/10.1210/endo-110-2-663>
 15. Basmaciogullari, A., Cras-Meneur, C., Czernichow, P., & Scharfmann, R. (2000). Pancreatic pattern of expression of thyrotropin-releasing hormone during rat embryonic development. *Journal of Endocrinology*, 166(3), 481–488. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1660481>
 16. Basto-Abreu, A., López-Olmedo, N., Rojas-Martínez, R., Aguilar-Salinas, C. A., Shamah-Levy, T., Romero-Martínez, M., & Barquera, S. (2021). Prevalence of diabetes and glycemic control in Mexico: National results from 2018 and 2020. *Salud Pública de México*, 63(6), 725–733. <https://doi.org/10.21149/12842>
 17. Batten, T. F., Moons, L., Cambre, M. L., Vandesande, F., Seki, T., & Suzuki, M. (1990). Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive system in the brain and pituitary gland of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Teleostei). *General and Comparative Endocrinology*, 79(3), 385–392. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90068-W](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90068-W)
 18. Bauer, K. (1994). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing-hormone-degrading ectoenzyme. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), 387–396. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00387.x>

19. Bauer, K., Schomburg, L., Heuer, H., & Schäfer, M. K. (1999). Thyrotropin releasing hormone (TRH), the TRH-receptor and the TRH-degrading ectoenzyme; Three elements of a peptidergic signalling system. In *Results and Problems in Cell Differentiation* (Vol. 26, pp. 13–42). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49421-8_2
20. Bennett, G. W., Balls, M., Clothier, R. H., Marsden, C. A., Robinson, G., & Wemyss-Holden, G. D. (1981). Location and release of TRH and 5-HT from amphibian skin. *Cell Biology International Reports*, 5(2), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(81\)90023-0](https://doi.org/10.1016/0309-1651(81)90023-0)
21. Bernier, N. J., Flik, G., & Klaren, P. H. M. (2009). Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes. In *Fish Physiology* (Vol. 28, pp. 235–311). [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(09\)28006-X](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(09)28006-X)
22. Bi, Y., Wu, W., Shi, J., Liang, H., Yin, W., Chen, Y., Tang, S., Cao, S., Cai, M., Shen, S., et al. (2014). Role for sterol regulatory element binding protein-1c activation in mediating skeletal muscle insulin resistance via repression of rat insulin receptor substrate-1 transcription. *Diabetologia*, 57(3), 592–602. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3136-1>
23. Blanco, A. M. (2020). Hypothalamic- and pituitary-derived growth and reproductive hormones and the control of energy balance in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 287, 113322. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113322>
24. Boland, B. B., Rhodes, C. J., & Grimsby, J. S. (2017). The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Molecular Metabolism*, 6(9), 958–973. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.04.010>
25. Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C. Y., & Schally, A. V. (1969). The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 37(4), 705–710. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(69\)90868-7](https://doi.org/10.1016/0006-291X(69)90868-7)
26. Bommer, C., Sagalova, V., Heesemann, E., Manne-Goehler, J., Atun, R., Bärnighausen, T., Davies, J., & Vollmer, S. (2018). Global economic burden of diabetes in adults: Projections from 2015 to 2030. *Diabetes Care*, 41(5), 963–970. <https://doi.org/10.2337/dc17-1962>
27. Bu, G., Yong, T., Tang, Y., Luo, J., Ji, Y., Guo, L., Guo, S., Yang, S., Huang, L., Zeng, X., Sun, C., & Meng, F. (2025). Characterization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its receptors (TRHRs) in Nile tilapia: Molecular identification, ligand–receptor interaction and expression profile. *Peptides*, 191, 171426. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2025.171426>
28. Buckley, C., MacDonald, E. E., Tuziak, S. M., & Volkoff, H. (2010). Molecular cloning and characterization of two putative appetite regulators in winter

- flounder (*Pleuronectes americanus*): Preprothyrotropin-releasing hormone (TRH) and preproorexin (OX). *Peptides*, 31(9), 1737–1747. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.05.017>
29. Burgus, R., Dunn, T. F., Desiderio, D., & Guillemin, R. (1969). Structure moléculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d'origine ovine: Mise en évidence par spectrométrie de masse de la séquence PCA-His-Pro-NH₂. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Série D*, 269(19), 1870–1873.
 30. Campbell, J. H., Dixon, B., & Whitehouse, L. M. (2021). The intersection of stress, sex and immunity in fishes. *Immunogenetics*, 73(1), 111–129. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01194-2>
 31. Campbell, J. H., Dixon, B., & Whitehouse, L. M. (2021). The intersection of stress, sex and immunity in fishes. *Immunogenetics*, 73(1), 111–129. <https://doi.org/10.1007/s00251-020-01194-2>
 32. Capiotti, K. M., Antonioli, R., Jr., Kist, L. W., Bogo, M. R., Bonan, C. D., & Da Silva, R. S. (2014). Persistent impaired glucose metabolism in a zebrafish hyperglycemia model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 171, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.03.005>
 33. Carrera Boada, C. A., & Martínez-Moreno, J. M. (2013). Pathophysiology of diabetes mellitus type 2: Beyond the duo “insulin resistance–secretion deficit.” *Nutrición Hospitalaria*, 28(Suppl. 2), 78–87. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.sup2.6717>
 34. Charli, J. L., Rodríguez-Rodríguez, A., Hernández-Ortega, K., Cote-Vélez, A., Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., & Joseph-Bravo, P. (2020). The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: A therapeutic target? *Frontiers in Pharmacology*, 11, 640. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00640>
 35. Charli, J. L., Vargas, M. A., Cisneros, M., de Gortari, P., Baeza, M. A., Jasso, P., Bourdais, J., Pérez, L., Uribe, R. M., & Joseph-Bravo, P. (1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: Role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology (Bp)*, 6(1), 45–57.
 36. Chávez-Gutiérrez, L., Matta-Camacho, E., Osuna, J., Horjales, E., Joseph-Bravo, P., Maigret, B., & Charli, J. L. (2006). Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II: Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18581–18590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601392200>

37. Chen, L., Chen, X. W., Huang, X., Song, B. L., Wang, Y., & Wang, Y. (2019). Regulation of glucose and lipid metabolism in health and disease. *Science China Life Sciences*, 62(11), 1420–1458. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-1563-3>
38. Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., & Laakso, M. (2002). Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: The STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet*, 359(9323), 2072–2077. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08905-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08905-5)
39. Choi, J., Kim, J. E., Kim, T. K., Park, J. Y., Lee, J. E., Kim, H., Lee, E. H., & Han, P. L. (2015). TRH and TRH receptor system in the basolateral amygdala mediate stress-induced depression-like behaviors. *Neuropharmacology*, 97, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.030>
40. Christensen, A. A., & Gannon, M. (2019). The beta cell in type 2 diabetes. *Current Diabetes Reports*, 19(9), 81. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1196-4>
41. Ciosek, J., & Guzek, J. W. (1992). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and vasopressin and oxytocin release: In vitro as well as in vivo studies. *Experimental and Clinical Endocrinology*, 100(3), 152–159. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211197>
42. Colson, A. O., & Gershengorn, M. C. (2006). Thyrotropin-releasing hormone analogs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6(2), 221–226. <https://doi.org/10.2174/138955706775476019>
43. Cook, L. B., & Hinkle, P. M. (2004). Agonist-dependent up-regulation of thyrotrophin-releasing hormone receptor protein. *Biochemical Journal*, 380(Pt 3), 815–821. <https://doi.org/10.1042/BJ20031467>
44. Darenskaya, M. A., Kolesnikova, L. I., & Kolesnikov, S. I. (2021). Oxidative stress: Pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 171(2), 179–189. <https://doi.org/10.1007/s10517-021-05191-7>
45. Davies, M. J., D'Alessio, D. A., Fradkin, J., et al. (2022). ADA/EASD consensus report on the management of hyperglycemia in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 45(Suppl. 1), S1–S100. <https://doi.org/10.2337/dc22-S002>
46. Davies, M. J., Aroda, V. R., Collins, B. S., Gabbay, R. A., Green, J., Maruthur, N. M., Rosas, S. E., Del Prato, S., Mathieu, C., Mingrone, G., Rossing, P., Tankova, T., Tsapas, A., & Buse, J. B. (2022). *Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2022. A consensus report by the American Diabetes*

Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, 45(11), 2753–2786. <https://doi.org/10.2337/dci22-0034>

47. Deal, C. K., & Volkoff, H. (2020). The role of the thyroid axis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 596585. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.596585>
48. DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Medical Clinics of North America*, 88(4), 787–835. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2004.04.013>
49. De Groef, B., Grommen, S. V., & Darras, V. M. (2006). Increasing plasma thyroxine levels during late embryogenesis and hatching in the chicken are not caused by an increased sensitivity of the thyrotropes to hypothalamic stimulation. *Journal of Endocrinology*, 189(2), 271–278. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06492>
50. Dhawan, S., & Natarajan, R. (2019). Epigenetics and type 2 diabetes risk. *Current Diabetes Reports*, 19(8), 47. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1168-8>
51. Díaz, M. L., Becerra, M., Manso, M. J., & Anadón, R. (2002). Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) immunoreactivity in the brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology*, 450(1), 45–60. <https://doi.org/10.1002/cne.10300>
52. Dos Santos, M. M., de Macedo, G. T., Prestes, A. S., Ecker, A., Müller, T. E., Leitemperger, J., Fontana, B. D., Ardisson-Araújo, D. M. P., Rosemberg, D. B., & Barbosa, N. V. (2020). Modulation of redox and insulin signaling underlie the anti-hyperglycemic and antioxidant effects of diphenyl diselenide in zebrafish. *Free Radical Biology and Medicine*, 158, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.002>
53. Dubovy, S. R., Fernandez, M. P., Echegaray, J. J., Block, N. L., Unoki, N., Perez, R., Vidaurre, I., Lee, R. K., Nadji, M., & Schally, A. V. (2017). Expression of hypothalamic neurohormones and their receptors in the human eye. *Oncotarget*, 8(40), 66796–66814. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18358>
54. Dussault, J. H., & Labrie, F. (1975). Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the neonatal rat. *Endocrinology*, 97(5), 1321–1324. <https://doi.org/10.1210/endo-97-5-1321>

55. Eames, S. C., Philipson, L. H., Prince, V. E., & Kinkel, M. D. (2010). Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish*, 7(2), 205–213. <https://doi.org/10.1089/zeb.2009.0640>
56. Eizirik, D. L., Pasquali, L., & Cnop, M. (2020). Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: Different pathways to failure. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(7), 349–362. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0355-7>
57. Emerging Risk Factors Collaboration. (2011). Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *The New England Journal of Medicine*, 364(9), 829–841. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008862>
58. Faught, E., & Vijayan, M. M. (2019). Loss of the glucocorticoid receptor in zebrafish improves muscle glucose availability and increases growth. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, 316(6), E1093–E1104. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00045.2019>
59. Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*, 35(2), 159–194. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1087>
60. Feng, K., Su, J., Wu, Z., Su, S., & Yao, W. (2022). Molecular cloning and expression analysis of thyrotropin-releasing hormone, and its possible role in gonadal differentiation in rice field eel (*Monopterus albus*). *Animals*, 12(13), 1691. <https://doi.org/10.3390/ani12131691>
61. Ferguson, D., & Finck, B. N. (2021). Emerging therapeutic approaches for the treatment of NAFLD and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*, 17(8), 484–495. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00507-z>
62. Frías, J. P., Auerbach, P., Bajaj, H. S., Fukushima, Y., Lingvay, I., Macura, S., Søndergaard, A. L., Tankova, T. I., Tentolouris, N., & Buse, J. B. (2021). Efficacy and safety of once-weekly semaglutide 2.0 mg versus 1.0 mg in patients with type 2 diabetes (SUSTAIN FORTE): A double-blind, randomised, phase 3B trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9(9), 563–574. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00174-1)
63. Fröhlich, E., & Wahl, R. (2019). The forgotten effects of thyrotropin-releasing hormone: Metabolic functions and medical applications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 52, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2018.06.006>
64. Fukuchi, I., Asahi, T., Kawashima, K., Kawashima, Y., Yamamura, M., Matsuoka, Y., & Kinoshita, K. (1998). Effects of taltirelin hydrate (TA-0910), a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo dopamine release and turnover in rat brain. *Arzneimittelforschung*, 48(4), 353–359.

65. Gajbhiye, D. S., Fernandes, G. L., Oz, I., Nahmias, Y., & Golan, M. (2024). A transient neurohormonal circuit controls hatching in fish. *Science*, 386(6726), 1173–1178. <https://doi.org/10.1126/science.ad08929>
66. Gajbhiyauwen, L., Cavallin, J. E., Ankley, G. T., Bars, C., Gabriëls, I. J., Michiels, E. D. G., Fitzpatrick, K. R., Periz-Stanacev, J., Randolph, E. C., Robinson, S. L., Saari, T. W., Schroeder, A. L., Stinckens, E., Swintek, J., Van Cruchten, S. J., Verbueken, E., Villeneuve, D. L., & Knapen, D. (2018). Gene transcription ontogeny of hypothalamic-pituitary-thyroid axis development in early-life stage fathead minnow and zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 266, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.001>
67. Galas, L., Raoult, E., Tonon, M. C., Okada, R., Jenks, B. G., Castaño, J. P., Kikuyama, S., Malagon, M., Roubos, E. W., & Vaudry, H. (2009). TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 164(1), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.05.003>
68. Gáspár, E., Hardenbicker, C., Bodó, E., Wenzel, B., Ramot, Y., Funk, W., Kromminga, A., & Paus, R. (2010). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): A new player in human hair-growth control. *The FASEB Journal*, 24(2), 393–403. <https://doi.org/10.1096/fj.08-126417>
69. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
70. Genario, R., Giacomini, A. C. V. V., de Abreu, M. S., Marcon, L., Demin, K. A., & Kalueff, A. V. (2020). Sex differences in adult zebrafish anxiolytic-like responses to diazepam and melatonin. *Neuroscience Letters*, 714, 134548. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134548>
71. Gong, Y., Zhai, G., Su, J., Yang, B., Jin, J., Liu, H., Yin, Z., Xie, S., & Han, D. (2018). Different roles of insulin receptor a and b in maintaining blood glucose homeostasis in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 269, 33–45. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.08.012>
72. González-Mujica, F. (2017). Mecanismo de acción de la insulina. *VITAE Academia Biomédica Digital*, (72), 1–12. http://vitae.ucv.ve/?module=articulo_pdf&n=5653&rv=137
73. González-Ortiz, M., Medina-Santillán, R., Martínez-Abundis, E., & von Drateln, C. R. (2001). Effect of glycine on insulin secretion and action in

- healthy first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients. *Hormone and Metabolic Research*, 33(6), 358–360. <https://doi.org/10.1055/s-2001-15421>
74. Gorissen, M., & Flik, G. (2016). The endocrinology of the stress response in fish: An adaptation–physiological view. In C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell, & C. J. Brauner (Eds.), *Fish physiology* (Vol. 35, pp. 75–111). Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00003-5>
 75. Goto, M., Yoneda, M., Nakamura, K., Terano, A., & Haneda, M. (2004). Effect of central thyrotropin-releasing hormone on pancreatic blood flow in rats. *Regulatory Peptides*, 121(1–3), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.04.006>
 76. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. (2020) ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*. Mar;19(3):1997-2007. doi: 10.3892/etm.2020.8454. Epub 2020 Jan 15. PMID: 32104259; PMCID: PMC7027163.
 77. Gut, P., Baeza-Raja, B., Andersson, O., Hasenkamp, L., Hsiao, J., Hesselson, D., Akassoglou, K., Verdin, E., Hirschey, M. D., & Stainier, D. Y. (2013). Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism. *Nature Chemical Biology*, 9(2), 97–104. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1136>
 78. Hamano, K., Inoue, K., & Yanagisawa, T. (1990). Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the brain of carp, *Cyprinus carpio*. *General and Comparative Endocrinology*, 80, 85–92. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(90\)90151-B](https://doi.org/10.1016/0016-6480(90)90151-B)
 79. Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C. F., Chandrankunnel, A., Nillni, E. A., Bjørbaek, C., Elmquist, J. K., Flier, J. S., & Hollenberg, A. N. (2001). Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 111–120. <https://doi.org/10.1172/JCI10741>
 80. Heuer, H., Schäfer, M. K., & Bauer, K. (1998). The thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme: The third element of the thyrotropin-releasing hormone-signaling system. *Thyroid*, 8(10), 915–920. <https://doi.org/10.1089/thy.1998.8.915>
 81. Holman, G. D. (2018). Chemical biology probes of mammalian GLUT structure and function. *Biochemical Journal*, 475(22), 3511–3534. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170677>

82. Hu, Y., Xie, S., & Yao, J. (2016). Identification of novel reference genes suitable for qRT-PCR normalization with respect to the zebrafish developmental stage. *PLOS ONE*, 11(2), e0149277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149277>
83. International Diabetes Federation. (2021). *IDF diabetes atlas* (10th ed.). International Diabetes Federation.
84. Jackson, I. M., & Reichlin, S. (1977). Thyrotropin-releasing hormone: Abundance in the skin of the frog, *Rana pipiens*. *Science*, 198(4315), 414–415. <https://doi.org/10.1126/science.410104>
85. Jones-Bolin, S. (2012). Guidelines for the care and use of laboratory animals in biomedical research. *Current Protocols in Pharmacology*, Appendix 4, Appendix 4B. <https://doi.org/10.1002/0471141755.pha04bs59>
86. Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., & Charli, J. L. (2015). Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *Journal of Endocrinology*, 224(3), R139–R159. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0593>
87. Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., & Charli, J. L. (2016). Advances in TRH signaling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 17(4), 545–558. <https://doi.org/10.1007/s11154-016-9375-y>
88. Kim, A., Miller, K., Jo, J., Kilimnik, G., Wojcik, P., & Hara, M. (2009). Islet architecture: A comparative study. *Islets*, 1(2), 129–136. <https://doi.org/10.4161/isl.1.2.9480>
89. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
90. Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., & Prince, V. E. (2010). Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, (42), 2126. <https://doi.org/10.3791/2126>
91. Kline, T. L., Sussman, C. R., Irazabal, M. V., Mishra, P. K., Pearson, E. A., Torres, V. E., & Macura, S. I. (2019). Three-dimensional NMR microscopy of zebrafish specimens. *NMR in Biomedicine*, 32(1), e4031. <https://doi.org/10.1002/nbm.4031>
92. Konadu, B., Hosler, J. P., Gibert, Y., & Edwards, K. S. (2023). Analysis of oxygen consumption rates in zebrafish reveals differences based on sex, age and physical activity recovery. *Frontiers in Physiology*, 14, 1272366. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1272366>

93. Kozłowski, T. M., Jönsson, M., Ek, F., Olsson, R., & Kröger, R. H. H. (2018). Osmotic concentration of zebrafish (*Danio rerio*) body fluids is lower in larvae than in adults. *Zebrafish*, 15(1), 9–14. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1504>
94. Laakkonen, L. J., Guarnieri, F., Perlman, J. H., Gershengorn, M. C., & Osman, R. (1996). A refined model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket: Novel mixed mode Monte Carlo/stochastic dynamics simulations of the complex between TRH and TRH receptor. *Biochemistry*, 35(24), 7651–7663. <https://doi.org/10.1021/bi952203j>
95. Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1–4), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
96. Lawrence, M. C. (2021). Understanding insulin and its receptor from their three-dimensional structures. *Molecular Metabolism*, 52, 101255. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101255>
97. Lazcano, I., Joseph-Bravo, P., & Orozco, A. (2025). The evolution of hypothalamic-pituitary-thyroid axis. In V. Grinevich & R. Oliveira (Eds.), *Evolutionary and comparative neuroendocrinology* (Masterclass in Neuroendocrinology, Vol. 17). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-80209-6_7
98. Lazcano, I., Pech-Pool, S. M., Olvera, A., García-Martínez, I., Palacios-Pérez, S., & Orozco, A. (2023). The importance of thyroid hormone signaling during early development: Lessons from the zebrafish model. *General and Comparative Endocrinology*, 334, 114225. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2023.114225>
99. Lazcano, I., Rodríguez-Rodríguez, A., Uribe, R. M., Orozco, A., Joseph-Bravo, P., & Charli, J. L. (2021). Evolution of thyrotropin-releasing factor extracellular communication units. *General and Comparative Endocrinology*, 305, 113642. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113642>
100. Lazcano, I., Uribe, R. M., Martínez-Chávez, E., Vargas, M. A., Matziari, M., Joseph-Bravo, P., & Charli, J. L. (2012). Pyroglutamyl peptidase II inhibition enhances the analeptic effect of thyrotropin-releasing hormone in the rat medial septum. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342(1), 222–231. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.192278>
101. Lebovitz, H. E. (2019). Thiazolidinediones: The forgotten diabetes medications. *Current Diabetes Reports*, 19(12), 151. <https://doi.org/10.1007/s11892-019-1270-y>

102. Lee, S. H., Park, S. Y., & Choi, C. S. (2022). Insulin resistance: From mechanisms to therapeutic strategies. *Diabetes & Metabolism Journal*, 46(1), 15–37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
103. Lechan, R. M., & Fekete, C. (2006). The TRH neuron: A hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*, 153, 209–235. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)53012-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)53012-2)
104. Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
105. Li, X., Li, Z., Deng, Y., Zhang, J., Li, J., & Wang, Y. (2020). Characterization of a novel thyrotropin-releasing hormone receptor, TRHR3, in chickens. *Poultry Science*, 99(3), 1643–1654. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.062>
106. Li, Y., Hua, J., Tao, Y., Lu, S., Dong, Y., Jiang, B., Wang, Q., Qiang, J., & Xu, P. (2024). Comparative transcriptomics and metabolomics reveal specific biochemical responses in cultured largemouth bass (*Micropterus salmoides*) juveniles with sexual dimorphism. *Aquaculture*, 587, 740848. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740848>
107. Lin, C. Y., Chiang, C. Y., & Tsai, H. J. (2016). Zebrafish and medaka: New model organisms for modern biomedical research. *Journal of Biomedical Science*, 23, 19. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0236-5>
108. López Simarro, F., & Pérez Unanua, M. P. (2024). Diferencias y similitudes de la DM2 en hombres y mujeres: Lo que nos hace diferentes en diabetes. *Diabetes*, 86.
109. Lovic, D., Piperidou, A., Zografou, I., Grassos, H., Pittaras, A., & Manolis, A. (2020). The growing epidemic of diabetes mellitus. *Current Vascular Pharmacology*, 18(2), 104–109. <https://doi.org/10.2174/1570161117666190405165911>
110. Luo, L. G., & Yano, N. (2004). Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor in immortalized beta-cell lines and rat pancreas. *Journal of Endocrinology*, 181(3), 401–412. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1810401>
111. Luo, L., Luo, J. Z., & Jackson, I. M. (2008). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) reverses hyperglycemia in rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(1), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.111>

112. Malone, J. I., & Hansen, B. C. (2019). Does obesity cause type 2 diabetes mellitus (T2DM)? Or is it the opposite? *Pediatric Diabetes*, 20(1), 5–9. <https://doi.org/10.1111/medi.12787>
113. Marso, S. P., Bain, S. C., Consoli, A., et al. (2016). Semaglutide and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 375(19), 1834–1844. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607141>
114. Martino, E., Nardi, M., Vaudagna, G., Simonetti, S., Cilotti, A., Pinchera, A., Venturi, G., Seo, H., & Baschieri, L. (1980). Thyrotropin-releasing hormone-like material in human retina. *Journal of Endocrinological Investigation*, 3(3), 267–271. <https://doi.org/10.1007/BF03348274>
115. Matsuda, H. (2018). Zebrafish as a model for studying functional pancreatic β -cells development and regeneration. *Development, Growth & Differentiation*, 60(6), 393–399. <https://doi.org/10.1111/dgd.12565>
116. McCarthy, E., Rowe, C. J., Crowley-Perry, M., & Connaughton, V. P. (2021). Alternate immersion in glucose to produce prolonged hyperglycemia in zebrafish. *Journal of Visualized Experiments*, 171, e61935. <https://doi.org/10.3791/61935>
117. Mekuchi, M., Saito, Y., Aoki, Y., Masuda, T., Iigo, M., & Yanagisawa, T. (2011). Molecular cloning, gene structure, molecular evolution and expression analyses of thyrotropin-releasing hormone receptors from medaka (*Oryzias latipes*). *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 374–380. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.10.013>
118. Melloul, D., Marshak, S., & Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 45(3), 309–326. <https://doi.org/10.1007/s00125-001-0728-y>
119. Mendívil Anaya, C. O., & Sierra Ariza, I. D. (2005). Acción insulínica y resistencia a la insulina: Aspectos moleculares. *Revista de la Facultad de Medicina*, 53(4), 237–250.
120. Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P., & Woutersen, R. A. (2011). Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5), 759–775. <https://doi.org/10.1177/0192623311409597>
121. Mills, M. G., & Gallagher, E. P. (2017). A targeted gene expression platform allows for rapid analysis of chemical-induced antioxidant mRNA expression in zebrafish larvae. *PLOS ONE*, 12(2), e0171025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171025>

122. Mitsuma, T., Rhue, N., Sobue, G., Hirooka, Y., Kayama, M., Yokoi, Y., Adachi, K., Nogimori, T., Sakai, J., & Sugie, I. (1995). Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor in rats: An immunohistochemical study. *Endocrine Regulations*, 29(3), 129–134.
123. Morley, J. E., Garvin, T. J., Pekary, A. E., & Hershman, J. M. (1977). Thyrotropin-releasing hormone in the gastrointestinal tract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 79(1), 314–318.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90097-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90097-3)
124. Mulvihill, E. E., & Drucker, D. J. (2014). Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Endocrine Reviews*, 35(6), 992–1019. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1035>
125. Mulla, C. M., Geras-Raaka, E., Raaka, B. M., & Gershengorn, M. C. (2009). High levels of thyrotropin-releasing hormone receptors activate programmed cell death in human pancreatic precursors. *Pancreas*, 38(2), 197–202. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e31818d14a8>
126. Najvirtová, M., Bacová, Z., Mátéffyová, A., & Strbák, V. (2005). A role of thyrotropin-releasing hormone in insulin secretion by isolated rat pancreatic islets. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*, 449(6), 547–552.
<https://doi.org/10.1007/s00424-004-1362-6>
127. Navale, A. M., & Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: Physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, 8(1), 5–9.
<https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2>
128. Nesto, R. W., Bell, D., Bonow, R. O., Fonseca, V., Grundy, S. M., Horton, E. S., Le Winter, M., Porte, D., Semenkovich, C. F., Smith, S., Young, L. H., & Kahn, R. (2003). Thiazolidinedione use, fluid retention, and congestive heart failure: A consensus statement from the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*, 108(23), 2941–2948. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000103683.99399.7E>
129. Newsholme, P., & Krause, M. (2012). Nutritional regulation of insulin secretion: Implications for diabetes. *Clinical Biochemistry Reviews*, 33(2), 35–47.
130. Nillni, E. A. (2010). Regulation of the hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 31(2), 134–156.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2010.01.001>

131. Nipu, N., Antomagesh, F., Faught, E., & Vijayan, M. M. (2022). Glucocorticoid receptor activation reduces food intake independent of hyperglycemia in zebrafish. *Scientific Reports*, 12(1), 15677. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19572-z>
132. Norton, L., Shannon, C., Gastaldelli, A., & DeFronzo, R. A. (2022). Insulin: The master regulator of glucose metabolism. *Metabolism*, 129, 155142. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155142>
133. Ojo, O. A., Ibrahim, H. S., Rotimi, D. E., Ogunlakina, A. D., & Ojo, A. B. (2023). Diabetes mellitus: From molecular mechanism to pathophysiology and pharmacology. *Medicine in Novel Technology and Devices*, 19, 100247. <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2023.100247>
134. Pan, Y.-X., Zhuo, M.-Q., Li, D.-D., Xu, Y.-H., Wu, K., & Luo, Z. (2019). SREBP-1 and LXR α pathways mediated Cu-induced hepatic lipid metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 215, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.058>
135. Park, S. Y., Gautier, J. F., & Chon, S. (2021). Assessment of insulin secretion and insulin resistance in humans. *Diabetes & Metabolism Journal*, 45(5), 641–654. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0220>
136. Pascual Alonso, I., Almeida García, F., Valdés Tresanco, M. E., et al. (2023). Marine invertebrates: A promissory still unexplored source of inhibitors of biomedically relevant metallo aminopeptidases belonging to the M1 and M17 families. *Marine Drugs*, 21(5), 279. <https://doi.org/10.3390/md21050279>
137. Pech-Pool, S., Berumen, L. C., Martínez-Moreno, C. G., García-Alcocer, G., Carranza, M., Luna, M., & Arámburo, C. (2020). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and somatostatin (SST), but not growth hormone-releasing hormone (GHRH) nor ghrelin (GHRL), regulate expression and release of immune growth hormone (GH) from chicken bursal B-lymphocyte cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1436. <https://doi.org/10.3390/ijms21041436>
138. Peres Díaz, L. S., Schuman, M. L., Asisovich, M., Toblli, J. E., Pirola, C. J., Landa, M. S., & García, S. I. (2018). Angiotensin II requires an intact cardiac thyrotropin-releasing hormone system to induce cardiac hypertrophy in mouse. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 124, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2018.09.009>
139. Pérez Díaz, M., de Azevedo Gomes, A. M., Quiroga Berdeal, M. I., & Bermúdez Pose, R. (2025). How to dissect zebrafish: A standardized

- sampling protocol for histological and molecular studies in adult zebrafish. *Zebrafish*, 22(3), 76–85. <https://doi.org/10.1089/zeb.2024.0184>
140. Perlman, J. H., Laakkonen, L. J., Guarnieri, F., Osman, R., & Gershengorn, M. C. (1996). A refined model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket: Experimental analysis and energy minimization of the complex between TRH and TRH receptor. *Biochemistry*, 35(24), 7643–7650. <https://doi.org/10.1021/bi952202r>
 141. Prince, V. E., Anderson, R. M., & Dalgin, G. (2017). Zebrafish pancreas development and regeneration: Fishing for diabetes therapies. *Current Topics in Developmental Biology*, 124, 235–276. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.10.005>
 142. Proks, P., Reimann, F., Green, N., Gribble, F., & Ashcroft, F. (2002). Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*, 51(Suppl. 3), S368–S376. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2007.s368>
 143. Råbergh, C. M., Airaksinen, S., Soitamo, A., Björklund, H. V., Johansson, T., Nikinmaa, M., & Sistonen, L. (2000). Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *Journal of Experimental Biology*, 203(Pt 12), 1817–1824. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.12.1817>
 144. Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577–1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
 145. Reyes-García, R., Moreno-Pérez, Ó., Tejera-Pérez, C., et al. (2019). Documento de abordaje integral de la diabetes tipo 2. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, 66(7), 443–458. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2018.10.010>
 146. Robison, B. D., Drew, R. E., Murdoch, G. K., Powell, M., Rodnick, K. J., Settles, M., Stone, D., Churchill, E., Hill, R. A., Papasani, M. R., et al. (2008). Sexual dimorphism in hepatic gene expression and the response to dietary carbohydrate manipulation in the zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 3(2), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.01.001>
 147. Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., Castro-Porras, L., Gómez-Velasco, D., Romero-Martínez, M., & Aguilar-Salinas, C. A. (2024). Cardiovascular risk factors and vascular complications in adults with early- and late-onset diabetes in Mexico: Ensanut 2018. *Salud Pública de México*, 66, 277–287. <https://doi.org/10.21149/15786>

148. Rotllant, J., Balm, P. H., Ruane, N. M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S. E., & Tort, L. (2000). Pituitary proopiomelanocortin-derived peptides and hypothalamus–pituitary–interrenal axis activity in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) during prolonged crowding stress. *General and Comparative Endocrinology*, 119(2), 152–163. <https://doi.org/10.1006/gcen.2000.7508>
149. Ruiz-Jarabo, I., Martos-Sitcha, J. A., Barragán-Méndez, C., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., & Arjona, F. J. (2018). Gene expression of thyrotropin- and corticotrophin-releasing hormones is regulated by environmental salinity in the euryhaline teleost *Sparus aurata*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(2), 615–628. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0457-x>
150. Saito, Y., Mekuchi, M., Kobayashi, N., Kimura, M., Aoki, Y., Masuda, T., Azuma, T., Fukami, M., Iigo, M., & Yanagisawa, T. (2011). Molecular cloning, molecular evolution and gene expression of cDNAs encoding thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *General and Comparative Endocrinology*, 174(2), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.07.011>
151. Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
152. Schmitmeier, S., Thole, H., Bader, A., & Bauer, K. (2002). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *European Journal of Biochemistry*, 269(4), 1278–1286. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02768.x>
153. Secretaría de Salud. (2010). *NOM-015-SSA2-2010, para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus*. *Diario Oficial de la Federación*.
154. Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular Cell*, 6(1), 77–86.
155. Singh, A., Shadangi, S., Gupta, P. K., & Rana, S. (2025). Type 2 diabetes mellitus: A comprehensive review of pathophysiology, comorbidities,

- and emerging therapies. *Comprehensive Physiology*, 15(1), e70003. <https://doi.org/10.1002/cph4.70003>
156. Skyler, J. S., Bakris, G. L., Bonifacio, E., Darsow, T., Eckel, R. H., Groop, L., Groop, P.-H., Handelsman, Y., Insel, R. A., Mathieu, C., McElvaine, A. T., Palmer, J. P., Pugliese, A., Schatz, D. A., Sosenko, J. M., Wilding, J. P., Ratner, R. E. (2017). Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. *Diabetes*, 66(2), 241–255. <https://doi.org/10.2337/db16-0806>
 157. Slominski, A., & Wortsman, J. (2000). Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine Reviews*, 21(5), 457–487. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.5.0410>
 158. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
 159. Sower, S. A., Freamat, M., & Kavanaugh, S. I. (2009). The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: New insights from lampreys. *General and Comparative Endocrinology*, 161(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.11.023>
 160. Štrbák, V. (2018). Pancreatic thyrotropin releasing hormone and mechanism of insulin secretion. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(1), 378–384. <https://doi.org/10.1159/000494013>
 161. Sun, Y., Lu, X., & Gershengorn, M. C. (2003). Thyrotropin-releasing hormone receptors—Similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30(2), 87–97. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0300087>
 162. Sun, Y., Zupan, B., Raaka, B. M., Toth, M., & Gershengorn, M. C. (2009). TRH-receptor-type-2-deficient mice are euthyroid and exhibit increased depression and reduced anxiety phenotypes. *Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1601–1608. <https://doi.org/10.1038/npp.2008.217>
 163. Taché, Y., Yang, H., Miampamba, M., Martinez, V., & Yuan, P. Q. (2006). Role of brainstem TRH/TRH-R1 receptors in the vagal gastric cholinergic response to various stimuli including sham-feeding. *Autonomic Neuroscience*, 125(1–2), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2006.01.014>
 164. Tanvir, Z., Nelson, R. F., DeCicco-Skinner, K., & Connaughton, V. P. (2018). One month of hyperglycemia alters spectral responses of the

- zebrafish photopic electroretinogram. *Disease Models & Mechanisms*, 11(10), dmm035220. <https://doi.org/10.1242/dmm.035220>
165. Tarifeño-Saldivia, E., Lavergne, A., Bernard, A., Padamata, K., Bergemann, D., Voz, M. L., Manfroid, I., & Peers, B. (2017). Transcriptome analysis of pancreatic cells across distant species highlights novel important regulator genes. *BMC Biology*, 15(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0362-x>
 166. Tezze, C., Romanello, V., & Sandri, M. (2019). FGF21 as modulator of metabolism in health and disease. *Frontiers in Physiology*, 10, 419. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00419>
 167. Tiso, N., Moro, E., & Argenton, F. (2009). Zebrafish pancreas development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 312(1–2), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.018>
 168. Tokarz, V. L., MacDonald, P. E., & Klip, A. (2018). The cell biology of systemic insulin function. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2273–2289. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802095>
 169. Trubacova, R., Drastichova, Z., & Novotny, J. (2022). Biochemical and physiological insights into TRH receptor-mediated signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 981452. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.981452>
 170. Ubieto, R., Uribe, R. M., González, J. A., et al. (2007). BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus: Properties of the transduction pathway. *Brain Research*, 1174, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.026>
 171. van de Pol, I., Flik, G., & Gorissen, M. (2017). Comparative physiology of energy metabolism: Fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 36. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00036>
 172. Vargas, Y., Castro Tron, A. E., Rodríguez Rodríguez, A., Uribe, R. M., Joseph-Bravo, P., & Charli, J. L. (2024). Thyrotropin-releasing hormone and food intake in mammals: An update. *Metabolites*, 14(6), 302. <https://doi.org/10.3390/metabo14060302>
 173. Vergauwen, L., Cavallin, J. E., Ankley, G. T., Bars, C., Gabriëls, I. J., Michiels, E. D. G., Fitzpatrick, K. R., Periz-Stanacev, J., Randolph, E. C., Robinson, S. L., et al. (2018). Gene transcription ontogeny of hypothalamic-pituitary-thyroid axis development in early-life stage fathead minnow and

- zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 266, 87–100.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.05.001>
174. Wallis, M. (2010). Molecular evolution of the thyrotrophin-releasing hormone precursor in vertebrates: Insights from comparative genomics. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(6), 608–619.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.01996.x>
 175. Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)* (4th ed.). University of Oregon Press.
 176. Wiviott, S. D., Raz, I., Bonaca, M. P., et al. (2019). Dapagliflozin and cardiovascular outcomes in type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 380(4), 347–357. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812389>
 177. Yamada, M., Saga, Y., Shibusawa, N., et al. (1997). Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 10862–10867.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10862>
 178. Yamada, M., Shibusawa, N., Hashida, T., Ozawa, A., Monden, T., Satoh, T., & Mori, M. (2000). Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor subtype 1 in mouse pancreatic islets and HIT-T15, an insulin-secreting clonal beta cell line. *Life Sciences*, 66(12), 1119–1125.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00415-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00415-X)
 179. Yan, W., Peng, Y. R., van Zyl, T., Regev, A., Shekhar, K., Juric, D., & Sanes, J. R. (2020). Cell atlas of the human fovea and peripheral retina. *Scientific Reports*, 10(1), 9802. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66092-9>
 180. Yang, C., Wei, M., Zhao, Y., et al. (2023). Regulation of insulin secretion by the post-translational modifications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11, 1217189.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1217189>
 181. Yano, N., & Luo, L. (2004). Effect of thyrotropin releasing hormone (TRH) on gene expressions in rat pancreas: Approach by microarray hybridization. *Journal of the Pancreas*, 5(4), 193–204.
 182. Zang, L., Maddison, L. A., & Chen, W. (2018). Zebrafish as a model for obesity and diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 91.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091>
 183. Zeng, H., Carlson, B. A., Potdar, S., et al. (2007). The role of the thyrotropin-releasing hormone receptor in metabolic regulation: Evidence

- from TRH-R1 knockout mice. *Endocrinology*, 148(10), 5164–5173.
<https://doi.org/10.1210/en.2007-0451>
184. ZFIN. (2025). ZFIN: The zebrafish information network. <https://zfin.org/>
 185. Zheng, W., Xu, H., Lam, S. H., Luo, H., Karuturi, R. K., & Gong, Z. (2013). Transcriptomic analyses of sexual dimorphism of the zebrafish liver and the effect of sex hormones. *PLOS ONE*, 8(1), e53562.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053562>
 186. Zhou, L., Li, M., & Wang, D. (2021). Role of sex steroids in fish sex determination and differentiation as revealed by gene editing. *General and Comparative Endocrinology*, 313, 113893.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113893>
 187. Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J. M., et al. (2015). Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine*, 373(22), 2117–2128.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504720>
 188. Zuckerkandl, E., & Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *Journal of Theoretical Biology*, 8(2), 357–366.
[https://doi.org/10.1016/0022-5193\(65\)90083-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(65)90083-4)
 189. Zuckerkandl, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, 125, 1–15.

13. Anexos

Anexo 1. Disección y validación del páncreas del pez cebra adulto.

El páncreas del pez cebra es un órgano pequeño y anatómicamente disperso, lo que dificulta su aislamiento preciso desde un punto de vista técnico. En consecuencia, numerosos estudios analizan el tracto digestivo completo en lugar de realizar disecciones dirigidas específicamente al tejido pancreático (Houbrechts et al., 2019; Maddison et al., 2015). Si bien existen descripciones detalladas de la disección pancreática en la literatura (Chen et al., 2007; Menke et al., 2011; Pérez Díaz et al., 2025), estos protocolos no se aplican de manera rutinaria en la mayoría de los estudios. En contraste, el presente trabajo se fundamenta en estas contribuciones metodológicas previas para identificar y aislar de forma confiable el páncreas del pez cebra adulto, permitiendo así la realización de análisis moleculares específicos por tejido.

La orientación espacial del tejido pancreático se determinó mediante análisis histológico seriado de peces cebra adultos completos (3 mpf), seccionados a 10 μ m de espesor utilizando un micrótopo rotatorio (LEICA RM2135, Leica Biosystems, Alemania). Los ejemplares fueron fijados previamente en paraformaldehído (PFA) al 4% y posteriormente incluidos en parafina. Posteriormente se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina (H&E), las cuales permitieron la identificación de cúmulos acinares exocrinos e islotes endocrinos principales (homólogos a los islotes de Langerhans en mamíferos; Menke et al., 2011), los cuales se emplearon como referencias anatómicas. La inspección macroscópica de las muestras reveló que el páncreas se localiza en la región ventral, adyacente a la vesícula biliar, en estrecha proximidad al tracto gastrointestinal proximal y contiguo al bazo.

Guiados por estas referencias histológicas, se realizaron disecciones en fresco bajo un estereomicroscopio (Zeiss Discovery V12, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania) equipado con un lente Zeiss Plan S 1.0 $\times$ (FWD = 81 mm), una cámara Zeiss AxioCam Cc 5 y dos fuentes de iluminación LED Zeiss CL 6000. Se efectuó una incisión ventral para exponer la cavidad visceral, lo que permitió visualizar los lóbulos intestinales y hepáticos, las vejigas natatorias y, en el caso de las hembras, los ovocitos maduros. La masa visceral fue desplazada suavemente para exponer la vesícula biliar y el bazo (**Fig. 18 A–B**). Entre estas estructuras y el intestino proximal se identificó una estructura difusa, esférica y de tonalidad grisácea, la cual fue cuidadosamente disecada y extraída como una sola unidad (**Fig. 18 A–B**).

El tejido aislado se procesó para su validación histológica mediante cortes de parafina de 10 μ m teñidos con H&E, observándose una arquitectura acinar característica y la presencia de islotes endocrinos prominentes (**Fig. 19 A–C**). Como confirmación adicional, se realizó inmunofluorescencia empleando un anticuerpo

primario específico para insulina del pez cebra (anticuerpo anti-insulina de conejo, 1:500, Abcam, #ab210560, Cambridge, Reino Unido) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:1000, Invitrogen, #A-11008, Waltham, MA, EUA). El marcaje fluorescente confirmó la presencia de células endocrinas positivas para insulina en el tejido disecado (**Fig. 20 A–D**).

Para la validación molecular, el ARN extraído del páncreas disecado se utilizó para sintetizar cDNA, el cual se sometió a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando los genes de insulina (insa; 151 pb) y glucagón b (gcgb; 168 pb). Los cebadores fueron diseñados en nuestro laboratorio y se detallan a continuación:

- insa
sentido: 5'-TAAGCACTAACCCAGGCACA-3'
antisentido: 5'-TCCTGGGCAGATTTAGGAGGA-3'
- gcgb
sentido: 5'-GACCAGGAGAGCACAAGACT-3'
Antisentido: 5'-CGTCGTCCTCGTCCTGTTTT-3'

La amplificación de estos marcadores endocrinos confirmó el origen pancreático del tejido aislado y validó la precisión del protocolo de disección empleado (**Fig. 20 E**).

En conjunto, esta metodología proporciona un marco reproducible y anatómicamente preciso para el aislamiento del páncreas del pez cebra adulto.

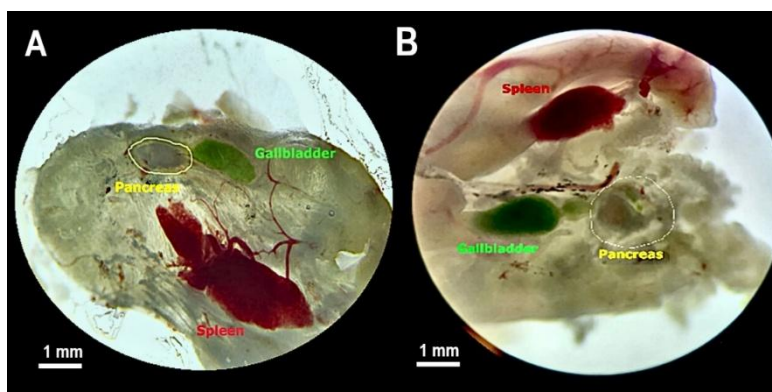


Figura 18. (Anexo) Localización visceral del tejido pancreático en el pez cebra adulto. (A, B) Identificación de los principales órganos digestivos, incluyendo el bazo (spleen; rojo), la vesícula biliar (gallbladder; verde), el páncreas (amarillo) y el tracto gastrointestinal. Los ejemplares se mantuvieron inmersos en PBS y fueron examinados bajo un estereomicroscopio equipado con una cámara digital utilizando iluminación incidente. Los órganos fueron anotados digitalmente para facilitar su reconocimiento anatómico. Barra de escala: 1 mm.

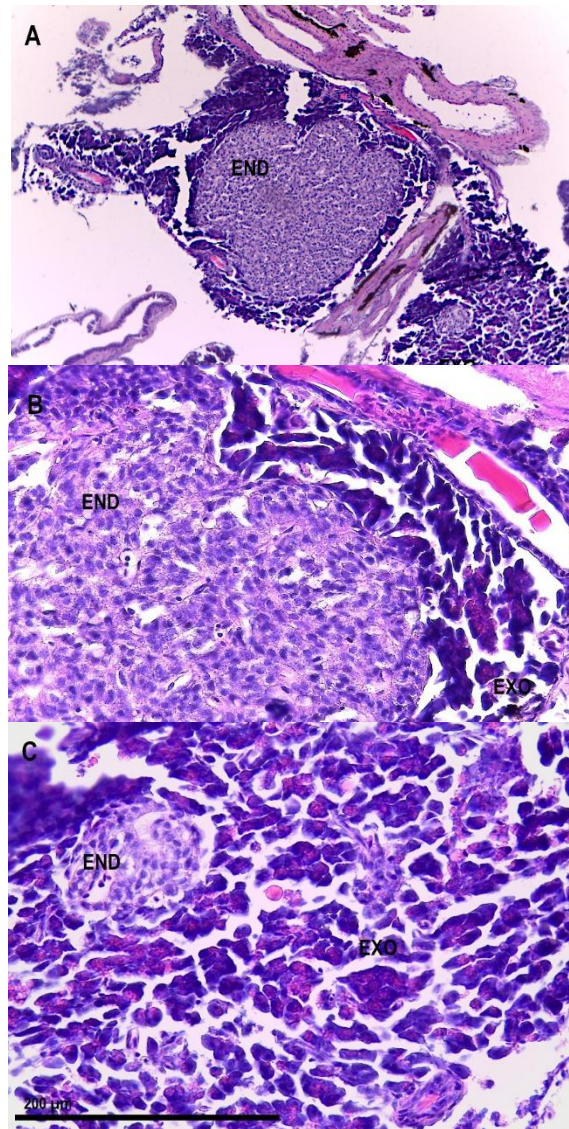


Figura 19. (Anexo) Identificación del tejido pancreático en cortes histológicos de pez cebra adulto teñidos con hematoxilina y eosina. Los paneles **A–C** muestran diferentes aumentos y regiones de islotes pancreáticos mostrando el tejido endocrino (END) rodeado por tejido acinar exocrino (EXO). Los cortes se realizaron de 10 μm y las micrografías se analizaron por microscopía focal. Barras de escala: 200 μm .

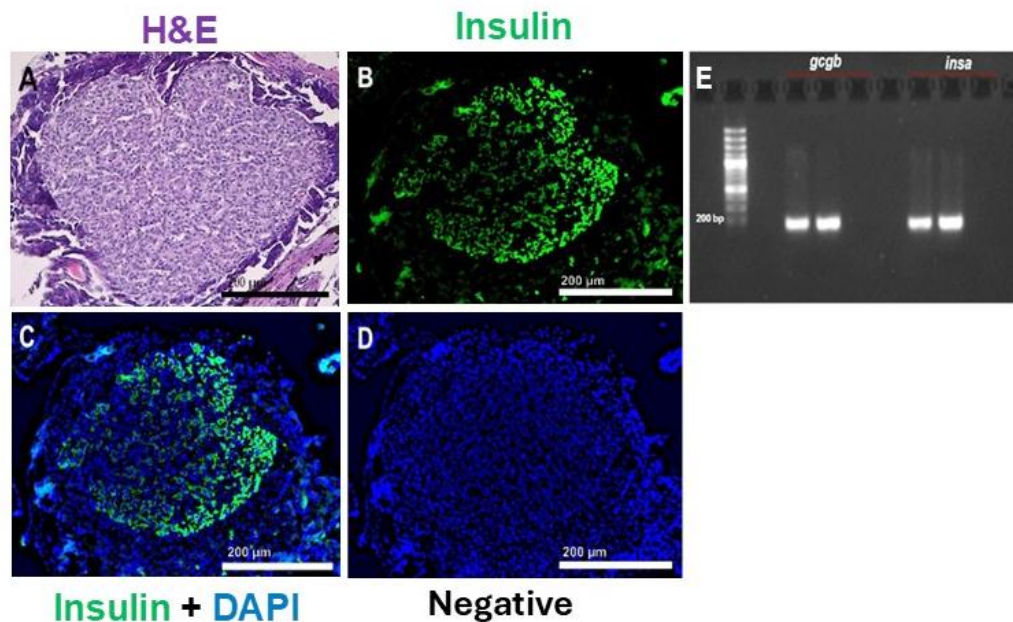


Figura 20. (Anexo) Detección de insulina en tejido pancreático de pez cebra adulto mediante inmunofluorescencia y análisis de los transcritos *insa* y *gcgb* por RT-PCR. Los paneles **A–D** muestran cortes histológicos de 10 µm: **(A)** tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de un islote pancreático endocrino; **(B)** inmunoreactividad al anticuerpo anti-insulina (verde); **(C)** imagen sobrelapa con DAPI; **(D)** control negativo sin anticuerpo primario. Barras de escala: 200 µm. **(E)** Electroforesis en gel de agarosa que muestra la amplificación de los transcritos de glucagón b (*gcgb*) e insulina (*insa*).

Anexo 2. Ensayo dosis–respuesta del efecto del tratamiento de la TRH exógena sobre los niveles de glucosa en sangre en el pez cebra adulto

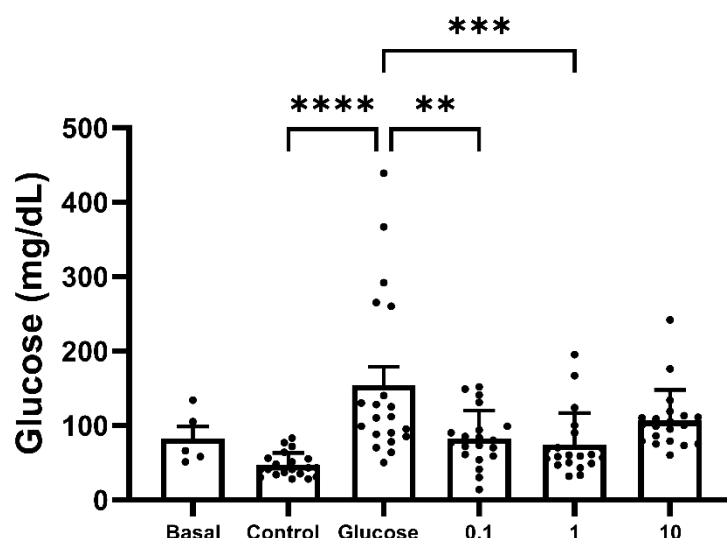


Figura 21. (Anexo) Ensayo dosis–respuesta del efecto de la TRH sobre los niveles de glucosa en sangre en pez cebra adulto. Se emplearon los siguientes grupos experimentales: un grupo basal, constituido por peces mantenidos bajo condiciones normales de alimentación, sin ayuno ni tratamiento; un grupo control, conformado por peces sometidos a ayuno e inyectados con vehículo (sham), sin exposición a glucosa; un grupo glucosa, integrado por peces expuestos a 111 mM de D-glucosa e inyectados con vehículo; y tres grupos tratados con TRH y glucosa, en los cuales los peces fueron expuestos a 111 mM de D-glucosa e inyectados por vía intraperitoneal con 0.1, 1 o 10 μ g de TRH por gramo de peso corporal, respectivamente. Todos los tratamientos se realizaron durante tres días consecutivos, siguiendo el protocolo descrito en la sección de Metodología 8.4.3. Cada grupo estuvo conformado por $n = 20$ peces, y los datos representan la media $\pm$ SEM de dos experimentos independientes combinados. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Tukey ($**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$).

Nota suplementaria. Validación de la dosificación de TRH y evaluación de seguridad

Durante el protocolo de exposición de tres días se observó un efecto claramente dependiente de la dosis sobre la supervivencia y el comportamiento de los peces. A la dosis más alta (10 µg de TRH/g de peso corporal), se registró una mortalidad del 60% dentro de las primeras 24–48 horas. Los peces tratados con esta dosis también presentaron alteraciones conductuales marcadas, incluyendo hiperactividad, respiración superficial en la superficie y nado errático con signos de ansiedad, consistentes con respuestas de estrés o sobrecarga fisiológica.

En contraste, las dosis de 0.1 y 1 µg de TRH/g de peso corporal mostraron una mortalidad aproximada del 10%, sin evidencia de comportamiento anormal. Los peces tratados con estas dosis mantuvieron patrones normales de nado y ventilación, así como un aspecto general saludable, sin signos de estrés o enfermedad a lo largo del experimento.

Con base en estas observaciones y en el perfil dosis–respuesta (**Fig. 21**), la dosis de 1 µg de TRH/g de peso corporal fue seleccionada para los experimentos subsecuentes, ya que produjo efectos consistentes sobre la glicemia sin inducir estrés ni toxicidad. La supervivencia, el comportamiento y los parámetros de calidad del agua (pH, conductividad) se mantuvieron dentro de rangos normales a esta dosis, lo que respalda su idoneidad para ensayos metabólicos en pez cebra adulto.

Anexo 3. Efecto de la insulina en el modelo de hiperglicemia del pez cebra adulto

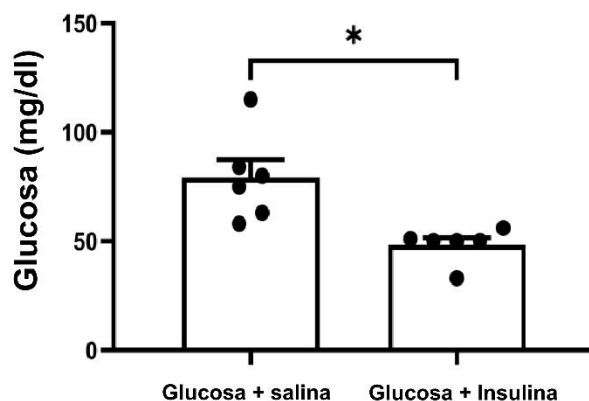


Figura 22. (Anexo). La administración *ip* de insulina reduce los niveles de glicemia en peces cebra con hiperglicemia. Peces cebra machos adultos fueron sometidos al protocolo de inmersión en glucosa para inducir hiperglicemia y posteriormente tratados con vehículo (solución salina) o insulina humana (1 UI/kg de peso corporal; n = 6 por grupo). La insulina se administró mediante una única inyección *ip* en un volumen de 1 μ L/g de peso corporal. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron 1 hora después de la inyección. Los datos se presentan como valores individuales, con barras que representan la media $\pm$ error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se realizó mediante prueba t de Student no pareada y bilateral. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (* $p < 0.05$). Los datos son representativos de un experimento independiente.

Anexo 4. Validación de los primers y análisis de la eficiencia de la qPCR

Para validar la eficiencia de amplificación de los primers utilizados en este estudio, se generaron curvas estándar a partir de diluciones seriadas de ADNc. Cada gen fue evaluado mediante qPCR utilizando el sistema SYBR Green, y se calcularon la pendiente de la curva, la eficiencia de amplificación y el coeficiente de determinación (R^2), con el fin de asegurar la especificidad y la eficiencia adecuada de cada par de cebadores. La información conseguida se detalla en la siguiente tabla:

Gen	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Tamaño amplicon (bp)	Rango de dilución	Puntos de dilución	Pendiente	Eficiencia (%)	R^2	Fuente
<i>trh</i>	TGGAGCCGGAGGT GAGAA	CGAGTGGGGTCCTCTT ACGAT	91	1:10 ¹ –1:10 ⁴	4	-3.9842	78	0.99	Liang et al., 2015
<i>trh-r1a</i>	TTTTCTACCACCA TCCCCG	TTGACCACCCATAACTG CCG	198	1:10 ¹ –1:10 ⁶	6	-3.8837	81	0.98	Diseñado en este estudio
<i>trh-r1b</i>	ACTGTGGAGCAGG GCCTCAT	ATGTCGAGCAGAACTG ACGA	295	1:10 ¹ –1:10 ⁷	7	-3.8223	82	0.98	Diseñado en este estudio
<i>trh-r2</i>	AAAGACCGGCTGA TGGGAGG	GAAGTCCAGGTAGTGC GTGCT	179	1:10 ¹ –1:10 ⁷	7	-3.7311	85	0.99	Diseñado en este estudio
<i>trh-r3</i>	GTCTTCGCTCTGC TCTCGTT	CAGTCGGCAGGTCGCT TTGA	191	1:10 ¹ –1:10 ⁴	4	-3.8994	80	0.98	Diseñado en este estudio
<i>trh-de</i>	AGAGTTTCTCGGC TCGTGAC	CGAGTCTCGTGGTGGT CGA	117	1:10 ¹ –1:10 ⁷	7	-3.8533	81	0.99	Diseñado en este estudio
<i>insa</i>	TAAGCACTAACCC AGGCACA	TCCTGGGCAGATTTAG GAGGA	151	1:10 ¹ –1:10 ⁷	7	-3.8523	81	0.99	Diseñado en este estudio
<i>slc2a2</i>	TTAACAGGCACGC TCGCTCT	TTCATGCTCTGTGCCAT TTCC	167	1:10 ¹ –1:10 ⁵	5	-3.1231	109	0.98	Diseñado en este estudio
<i>slc2a12</i>	GGGACAATCCTGG ACCACTA	ACATCCCAACCAGCATT CTC	156	1:10 ¹ –1:10 ⁴	4	-3.1889	105	0.98	Diseñado en este estudio
<i>ins-ra</i>	CGGTTCTGGGCAA AACAACA	GCAGGCCACGCATTG TTAG	200	1:10 ¹ –1:10 ⁵	5	-3.9075	80	0.99	Diseñado en este estudio
<i>actb1</i>	TGAATCCCAAAGC CAACAGAG	CCAGAGTCCATCACAAT ACCAG	139	1:10 ¹ –1:10 ⁶	6	-3.1138	109	0.96	Diseñado en este estudio
<i>18s rRNA</i>	GAACGCCACTTGT CCCTCT	GTTGGTGGAGCGATTT GTCT	118	1:10 ¹ –1:10 ⁵	5	-3.3213	100	0.99	Diseñado en este estudio

Tabla 4. (Anexo) Secuencias de los cebadores y parámetros de validación por qPCR de los genes diana analizados en este estudio. Todas las reacciones se realizaron en un volumen final de 8 μ L y se corrieron por triplicado. Se emplearon diluciones seriadas de ADNc para generar curvas estándar y determinar la eficiencia de amplificación. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando el mismo sistema de qPCR descrito en la sección de Métodos. Se incluyeron controles sin plantilla (NTC) en cada ensayo para descartar contaminación o la formación de dímeros de cebadores.