

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“MODIFICACIÓN DEL RECEPTOR A LEPTINA POR EFECTO  
DE LA SEROTONINA EN HIPOCAMPO DE RATA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**MARÍA DE LA PAZ JUÁREZ JUÁREZ**

DIRIGIDO POR

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2010



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“MODIFICACIÓN DEL RECEPTOR A LEPTINA  
POR EFECTO DE LA SEROTONINA EN HIPOCAMPO DE  
RATA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**MARÍA DE LA PAZ JUÁREZ JUÁREZ**

DIRIGIDO POR

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**SINODALES**

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**  
DIRECTOR

---

**Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**  
SINODAL

---

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**  
SINODAL

---

**BB. GINO FABRIZIO NORIS GARCÍA**  
SINODAL

---

## AGRADECIMIENTOS

*Dooy gracias a Dios por permitirme un logro más y el estar rodeada de personas maravillosas que me han brindado su apoyo.*

*Esta tesis está dedicada a mis padres, a quienes agradezco su confianza y apoyo por permitirme una formación profesional, por el sacrificio y esfuerzo realizado durante estos años, que a pesar de la distancia siempre están en mi mente y corazón.*

*A mis abuelos por darme tanto amor y preocuparse por mí, por sus consejos y sabiduría.*

*A mis hermanos: Pedro por tener siempre palabras de aliento y momentos llenos de alegría, a Lupe por ser mi ejemplo de progreso y perseverancia, por protegerme y permitirme aprender de él, a Cecy por demostrarme que querer es poder e Inés por estar dispuesta siempre a ayudarme y estar junto a mí.*

*A mis sobrinos: Omar por sus abrazos cada vez que regreso a casa, a Paola y Jonathan por formar parte de mi vida, a todos ellos por ser mi alegría.*

*A la doctora Guadalupe Alcocer por dirigir mi tesis y apoyarme para emprender camino en el ámbito laboral.*

*A la doctora Laura Berumen, Angelina Rodríguez y al doctor Gino Noris por dedicar tiempo a mi trabajo, a Jessica por su colaboración en la realización de esta tesis.*

*A Ariadna, Cristina, Paulina y Alejandro por recorrer juntos esta etapa, por todos aquellos momentos de alegría que compartimos juntos y a todas aquellas personas que han dejado huella en mi vida.*

*A Silvia, Eva, Luisa, Gabby y Esmeralda por la amistad que seguimos conservando a pesar del tiempo y la distancia.*

*A Omar por estar siempre dispuesto a ayudarme y por su agradable compañía.*

*Finalmente y no menos importante a Edgar por creer en mí y compartir juntos una nueva etapa y a la familia Moreno López por permitirme formar parte de su vida.*

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1. Encéfalo	2
II.2. Sistema límbico e Hipocampo	4
II.3. El receptor de leptina y su señalización	6
II.3.1 Mutación en el gen receptor de leptina	9
II.4. La leptina y el gen <i>ob</i>	9
II.4.1. Vía orexigénica y anorexigénica de la leptina	11
II.4.2. Gen <i>ob</i>	13
II.5. Regulación de la síntesis y liberación de leptina	13
II.6. Efecto de la leptina en la secreción de insulina	14
II.7. La leptina en la obesidad y en el proceso emocional	15
II.8. Intervención de la serotonina en la regulación de la alimentación	16
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	20
IV.1. General	20
IV.2. Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1. Materiales	21
V.2. Método	22
V.2.1 Tratamiento	22
V.2.2 Método inmunohistoquímico	23
V.2.3 Análisis de la inmunotinción	24

VI. RESULTADOS	25
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
VIII. CONCLUSIÓN	36
IX. BIBLIOGRAFÍA	37

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Función molecular y proceso biológico de la leptina, su receptor y el complejo leptina-receptor	10

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Núcleos hipotalámicos	3
2. Hipocampo	5
3. Representación esquemática de las seis isoformas del receptor de leptina	6
4. Activación del receptor de leptina	8
5. Vía orexigénica y anorexigénica	12
6. Negativo	25
7. Blanco	26
8. Inmunotinción contra receptores de leptina en hipocampo de las ratas control	27
9. Inmunotinción contra receptores de leptina en hipocampo de ratas tratadas con leptina	28
10. Inmunotinción contra receptores de leptina en hipocampo de ratas tratadas con serotonina	29
11. Inmunotinción contra receptores de leptina en hipocampo de ratas tratadas con leptina-serotonina	30

## RESUMEN

El hipocampo es una de las estructuras componentes del sistema límbico, entre sus funciones se encuentran: la regulación de las emociones, el comportamiento y la memoria; en esta estructura del sistema nervioso se ha demostrado la existencia de receptores de leptina. La leptina es una proteína sintetizada principalmente por adipocitos y se encuentra circulando en el plasma en cantidades proporcionales al contenido de grasa en el cuerpo. Sus funciones son la regulación central del equilibrio de energía, decremento en la alimentación e incremento en el gasto de energía. Otra molécula a la que se le relaciona con la alimentación, es la serotonina, un neurotransmisor que además interviene en el estado de ánimo, entre otras funciones fisiológicas. En el presente trabajo se pretende ver el efecto que tiene la leptina y la serotonina en el receptor de leptina. El modelo utilizado fue ratas Sprague Dawley que se sometieron a diferentes tratamientos: leptina, serotonina o leptina-serotonina. Los cambios en el receptor de leptina se compararon con la distribución del receptor en ratas control mediante inmunohistoquímica, para la cual una hora después de aplicado el tratamiento se obtuvo el encéfalo de las ratas. Posteriormente se aplicaron anticuerpos para identificar el receptor a leptina, además de usar como marcadores secundarios, anticuerpos secundarios biotinilados y el complejo estreptavidina-biotina, donde éste último, permite la amplificación de la señal obtenida. En los resultados se observó que la inmunotinción de los receptores de leptina en el hipocampo se incrementó respecto a las ratas control en los tres tratamientos aplicados. Lo anterior se debe a que la leptina estimula la expresión de sus receptores y la serotonina incrementa el nivel de leptina, incrementando de manera indirecta la expresión de los receptores Ob-R.



## I.INTRODUCCIÓN

La obesidad es un problema de salud pública, observándose en la actualidad un elevado porcentaje de población con sobrepeso y obesidad en México, además de un incremento notable de obesidad en la población infantil. Entre las causas se encuentran el cambio de vida que ha tenido la sociedad tanto en sus hábitos alimenticios, como de actividad física. Se ha propuesto que existe una relación entre la leptina y la obesidad. La leptina es una proteína que interviene en la regulación central del equilibrio de energía, decremento en la alimentación e incremento en el gasto de energía. Predomina una alta distribución de receptores de leptina en el núcleo arqueado, en el núcleo hipotalámico ventromedial, y el núcleo hipotalámico dorsomedial. Dentro del sistema límbico, al igual que los núcleos hipotalámicos, se encuentra el hipocampo, en donde se han encontrado receptores para leptina y al cual se le atribuyen como funciones principales el aprendizaje y la memoria, participa en convertir la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo.

Se ha relacionado la alimentación con el proceso emocional, afirmando que las emociones influyen en la alimentación. Considerando que el proceso emocional sea uno de los factores que intervienen en la prevalencia de la obesidad, y que la serotonina participa en las funciones del cerebro tales como el estado emocional, se pretende estudiar la influencia que tiene dicho neurotransmisor sobre la distribución de los receptores de leptina, debido a que la serotonina entre otros neurotransmisores, regula la frecuencia, duración, tamaño y calidad de las comidas. Defectos en la neurotransmisión dependientes de la serotonina provocan trastornos en el ánimo y una apetencia exagerada en el consumo de comidas ricas en carbohidratos.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Encéfalo

El hipocampo forma parte del encéfalo, siendo éste último, el centro donde se registran las sensaciones, se correlacionan unas con otras y se toman decisiones para emprender acciones. Así mismo, es el centro del intelecto, las emociones, la conducta y la memoria. El encéfalo consta de cuatro partes principales:

- El tallo encefálico es una continuación de la médula espinal y está formado por la médula oblongada, el puente de Varolio y el mesencéfalo.
- El cerebelo se encuentra en posición posterior a la médula oblongada.
- Arriba del tallo cerebral se encuentra el diencefalo, formado principalmente por tálamo, hipotálamo e incluye el epitálamo y subtálamo.
- El cerebro se extiende sobre el diencefalo como el sombrero de un hongo y ocupa casi todo el cráneo.

En el encéfalo se encuentra el sistema límbico formado por el lóbulo límbico del telencéfalo, así como del hipotálamo y varios núcleos talámicos mesencefálicos. Los componentes límbicos del telencéfalo comprenden las circunvoluciones cingular, parahipocámpica y subcallosa, así como la formación del hipocampo y los núcleos amigdalinos. Las funciones principales del hipocampo son el aprendizaje y la memoria.

Otra estructura que interviene en la regulación de la alimentación, además del hipocampo, es el hipotálamo cuyas funciones son la regulación del sistema nervioso autónomo, regulación de la hipófisis, de las emociones y el comportamiento, regulación de la ingestión de bebidas y alimentos, regulación de la temperatura corporal y regulación de los ritmos circadianos. En la Figura 1 se puede observar que el hipotálamo se compone de una docena o más de núcleos:

- La región mamilar, es la más posterior al hipotálamo. Incluye los cuerpos mamilares y el núcleo hipotalámico posterior.
- La región tuberosa, la más amplia del hipotálamo, comprende los núcleos dorsomedial, ventromedial y arqueado, así como el infundíbulo.
- La región supraóptica, es el punto de cruzamiento de los nervios ópticos y contiene los núcleos supraóptico, hipotalámico anterior, paraventricular y supraquiasmático (Tortora y Reynolds, 2006).

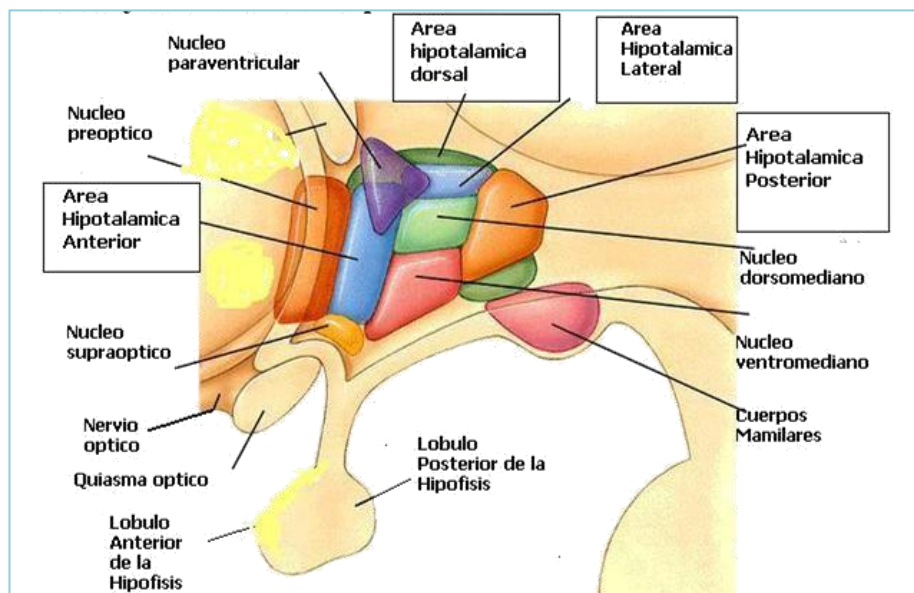


Figura 1. Núcleos hipotalámicos. El hipotálamo está formado por más de 12 núcleos, entre los cuales se encuentran: el núcleo hipotalámico posterior, dorsomedial, ventromedial, arqueado, supraóptico, hipotalámico anterior y paraventricular (Modificado de Bonet, 2008).

La regulación hipotalámica del apetito depende principalmente de la interacción de dos áreas: un centro de alimentación lateral en el núcleo del fascículo medial del prosencéfalo y un centro de saciedad en el núcleo ventromedial (Ganong, 2006). El centro de la alimentación es el origen de la sensación del hambre; cuando se han ingerido alimentos suficientes, ocurre la estimulación al centro de la saciedad que inhibe el centro de la alimentación (Tortora y Reynolds, 2006). Cuando se estimula eléctricamente el núcleo

ventromedial, un animal que esté comiendo se detiene repentinamente y muestra absoluta indiferencia hacia la comida. Por otra parte, si se destruye esta área bilateralmente, el animal se muestra insaciable, los centros hipotalámicos del hambre se tornan hiperactivos y el apetito voraz causa, en última instancia, una obesidad enorme (Guyton, 2001). La destrucción del centro del hambre en ratas con lesiones en el centro de la saciedad causa anorexia, lo cual indica que el centro de saciedad funciona mediante la inhibición del centro del hambre. Al parecer el centro del hambre mantiene una actividad crónica, la cual se inhibe en forma transitoria por la actividad del centro de saciedad, después de la ingesta de alimento (Ganong, 2006).

## II.2. Sistema Límbico e Hipocampo.

Una de las regiones componentes del sistema límbico, indicadas anteriormente, es el hipocampo. El hipocampo es la parte alargada de la corteza cerebral, que se pliega hacia dentro para formar la superficie ventral de casi todo el interior del ventrículo lateral, como lo muestra la Figura 2. Un extremo del hipocampo desemboca en los núcleos amigdalinos y se fusiona a lo largo de uno de sus bordes con la circunvolución parahipocámpica, que es la corteza de la cara ventromedial externa del lóbulo temporal (Guyton, 2001).

Casi cualquier tipo de experiencia sensitiva activa por lo menos parte del hipocampo, y a su vez el hipocampo distribuye muchas señales eferentes al tálamo anterior, al hipotálamo y a otras partes del sistema límbico, en especial a través del trígono, una importante vía de comunicación. Por lo tanto, el hipocampo es un canal adicional a través del cual las señales sensitivas aferentes inician reacciones conductuales apropiadas pero con propósitos distintos. Como ocurre con otras estructuras límbicas, la estimulación de diferentes áreas del hipocampo puede causar casi cualquier patrón de conducta, como placer, rabia, pasividad o impulso sexual excesivo. Otra característica del hipocampo es su hiperexcitabilidad habitual. Probablemente una de las razones de la hiperexcitabilidad del hipocampo,

es que su corteza difiere de la del resto del cerebro, ya que sólo posee tres capas de células nerviosas en algunas partes, en vez de las seis capas de otras zonas.

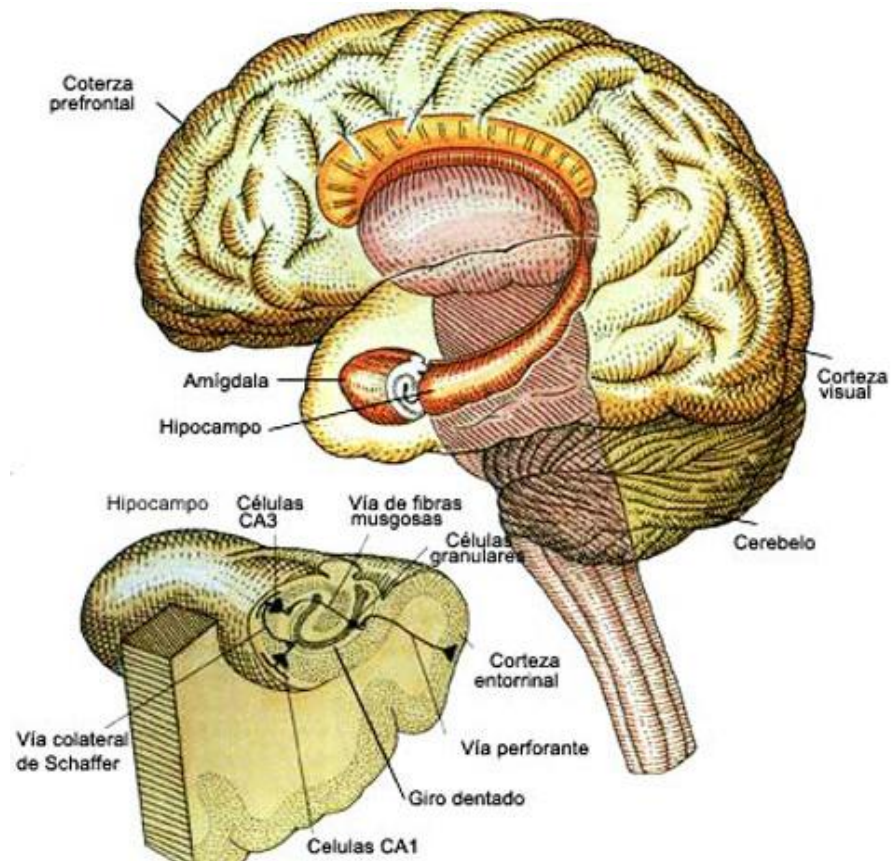


Figura 2. Hipocampo. El hipocampo es la parte alargada de la corteza cerebral, tiene el tamaño de un dedo pulgar de niño, y se encuentra localizado en la profundidad de la porción media del lóbulo temporal (Yuste, 2009).

Debido a que el hipocampo se origina como parte de la corteza olfativa, en los animales muy inferiores contribuye de manera esencial para determinar si debe comerse un alimento, si el olor de un objeto dado sugiere peligro o si el olor corporal induce excitación sexual, es decir, toma decisiones de importancia vital (Guyton, 2001).

### II.3. El receptor de leptina y su señalización.

En el hipocampo se ha demostrado la existencia de receptores de leptina, denominándose Ob-R, de los cuales se conocen seis isoformas, generadas por corte y empalme del gen *db*. Estas isoformas, designadas Ob-Ra a Ob-Rf, como se muestra en la Figura 3, tienen idénticos dominios extracelulares N-Terminal comprendidos por 800 aminoácidos, donde se encuentra el sitio de unión con la leptina, pero tienen distintas regiones intracelulares C-terminal. Ob-Re es una forma distinta de las otras isoformas y es el predominante sitio de unión de leptina en el plasma (Harvey, 2007), además funciona como un regulador de la concentración de hormona libre (Sánchez, 2005).

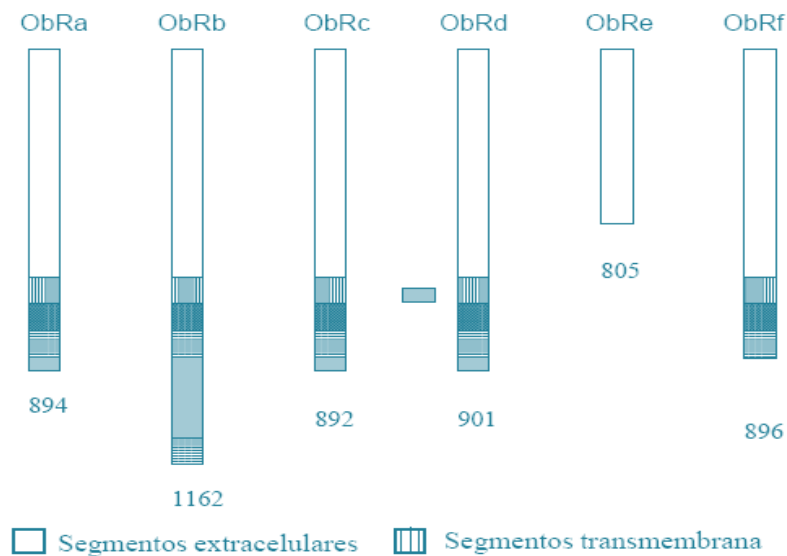


Figura 3. Representación esquemática de las seis isoformas del receptor de leptina. Estos receptores muestran dominios extracelulares N-Terminal idénticos, lugar de unión de la leptina, pero distintas regiones intracelulares C-terminal (Sánchez, 2005).

Las isoformas del receptor de leptina caen dentro de tres clases: secretada, corta y larga. Las formas secretadas son productos de corte y empalme, o productos de hendidura proteolítica de formas Ob-R de la membrana plasmática:

estas contienen sólo dominios extracelulares de unión a leptina y complejos con leptina en circulación, tal vez regulando concentraciones libres de leptina. Los receptores de forma pequeña (Ob-Ra) y larga (Ob-Rb) contienen dominios extracelulares y transmembranales iguales, también como los mismos primeros 29 aminoácidos intracelulares y discrepan en la secuencia secundaria a corte y empalme de exones 3' (Myers, 2004). Los receptores de leptina en el hipotálamo juegan un papel importante en el control de la termogénesis, función neuroendocrina y formación del hueso (O'Malley, 2007).

El receptor de leptina muestra homología a los receptores de citocina de clase I, los cuales son caracterizados por motivos extracelulares de cuatro residuos de cisteína y un número de regiones de fibronectina tipo III. El receptor de leptina se activa por cambios conformacionales que ocurren seguidos de la unión del ligando al receptor (Harvey, 2007).

Las JAK (Janus Kinasas) son una familia de tirosincinasas intracelulares que autofosforilan en numerosos residuos de tirosina así como también fosforilan residuos de tirosina en Ob-Rb durante la estimulación de leptina (Leshan y col., 2006). Como se observa en la Figura 4, Ob-Rb activa de manera preferencial a JAK2, lo que induce la autofosforilación del complejo Ob-Rb-JAK2. A su vez, JAK2 fosforila a las proteínas con dominios SH2 (Sánchez, 2005; Myers, 2004), como lo son las familias de las STAT 3 y STAT 5 (proteínas transductor de señal y activador de transcripción 3 y 5 respectivamente), así como las proteínas IRS (sustrato del receptor de insulina). Previo a la activación de las STAT 3 y 5, JAK2 fosforila los residuos de tirosina Tyr1077 y Tyr1138 generando sitios de unión para las STATs, una vez que éstas últimas son fosforiladas, se translocan al núcleo donde funcionan como reguladoras transcripcionales de POMC (propiomelanocortina), AgRP (proteína relacionada con Aguti) y SOCS3 (proteína supresora de la señalización por citosinas 3), (Fruhbeck, 2006; Vazquez, 2006). La expresión endógena de SOCS3 inhibe la fosforilación de residuos de tirosina de Ob-R por lo que induce un mecanismo de retroalimentación negativa para la señalización del

receptor (Fruhbeck, 2006). Las proteínas IRS están relacionadas con la activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa, cuya función principal es convertir el fosfatidilinositol bifosfato en fosfatidilinositol trifosfato, conocido mediador de la liberación de calcio a partir de los depósitos intracelulares.

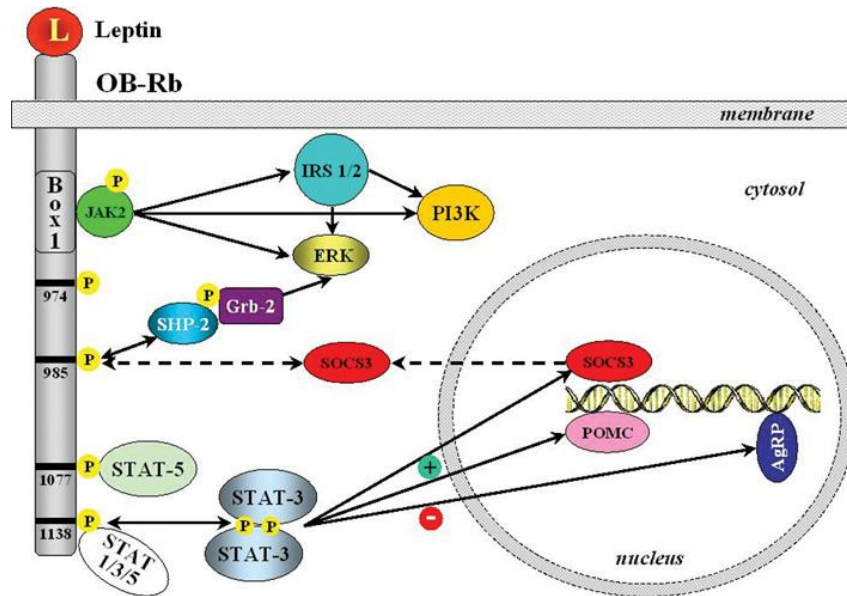


Figura 4. Activación del receptor de leptina. La unión de leptina a su receptor induce la activación intracelular de JAK2 y la posterior fosforilación de las proteínas IRS (sustrato del receptor de insulina), STAT3 y STAT5 (proteínas transductoras de señal y activadoras de transcripción 3 y 5 respectivamente). Las STATs son traslocadas al núcleo para estimular la expresión de SOCS3 (proteína supresora de la señalización por citosinas 3) y POMC (propiomelanocortina) así como para suprimir la expresión de AgRP (proteína relacionada con Aguti), (Fruhbeck, 2006).

Las neuronas del hipocampo expresan niveles altos de IRS-1, PI 3-cinasa y MAPK, éste último ha sido implicado también como un intermediario de la señalización para leptina (Shanley y col., 2002). La falta de señalización de leptina en ratones y humanos genéticamente nula para leptina o receptor de leptina resulta en obesidad secundaria a incremento de alimentación y decremento de utilización de energía (Myers, 2004).



### II.3.1 Mutación en el gen receptor de leptina

Una de las causas que originan la falla en la señalización de los receptores de leptina puede estar suscitada por una mutación en el gen de receptor de leptina, resultando en la unión anormal de leptina-receptor o generando un receptor de leptina mutado que carece de dominios transmembranales y/o dominios intracelulares. El receptor mutado circula a concentraciones elevadas, la leptina se une y resulta un elevado nivel de leptina en suero (Sadaf y col., 2007). En un estudio realizado mediante ontología génica se encontró que la interacción leptina-receptor de leptina realiza la misma función y el mismo proceso biológico que el receptor de leptina. Mientras que la función molecular y el proceso biológico de la leptina y el receptor de leptina son similares (Cuadro 1). Además, que el receptor de leptina ejerce un importante efecto supresor sobre la expresión de leptina (Wiwanitkit, 2007).

La falla de las señales de la leptina causadas por la mutación de leptina o del receptor de leptina resulta en un incremento en la alimentación en combinación con un fenotipo de gasto de energía reducido recordativo de la respuesta neuroendocrina del hambre (Leshan y col., 2006).

### II.4. La leptina y el gen *ob*.

La señalización de los receptores Ob-R, se inicia tras la unión de leptina, que es una proteína altamente conservada de 167 aminoácidos, y codificada por el gen obeso (*ob*), (Harvey, 2007; Smolinska, 2007; Lu, 2005). Esta es predominante, aunque no exclusivamente sintetizada por adipocitos y circula en el plasma en cantidades proporcionales al contenido de grasa en el cuerpo (Harvey, 2007; Myers, 2004), unida con varias proteínas plasmáticas como la albúmina (Sánchez, 2005).

Cuadro 1.- Función molecular y proceso biológico de la leptina, su receptor y el complejo leptina-receptor (Wiwanitkit, 2007).

	Función molecular	Proceso biológico
Leptina	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Unión a proteínas</li> <li>2. Actividad hormonal</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transducción de señal</li> <li>2. Señalización célula-célula</li> <li>3. Metabolismo de energía de reserva</li> </ol>
Receptor de leptina	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Actividad del receptor de Oncostatina M</li> <li>2. Actividad del receptor interleucina-6</li> <li>3. Actividad del receptor transmembrana</li> <li>4. Unión a proteínas</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transducción de señal</li> <li>2. Respuesta inmune</li> <li>3. Desarrollo</li> <li>4. Metabolismo de energía de reserva</li> <li>5. Regulación de vía de señalización N</li> </ol>
Leptina-receptor de leptina	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Actividad del receptor de Oncostatina M</li> <li>2. Actividad del receptor interleucina-6</li> <li>3. Actividad del receptor transmembrana</li> <li>4. Unión a proteínas</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transducción de señal</li> <li>2. Respuesta inmune</li> <li>3. Desarrollo</li> <li>4. Metabolismo de energía de reserva</li> <li>5. Regulación de vía de señalización N</li> </ol>

En ratas se sabe que la leptina presente en la leche materna puede ser absorbida por el estómago inmaduro de ratas amamantadas y transferida a la circulación de la rata bebé. La leptina proporcionada de leche materna es la principal fuente de leptina en el estómago durante la primera mitad del período lactante, considerando que la producción endógena de leptina por la mucosa gástrica incrementa en el fin del periodo de lactancia y con el cambio de dieta a

comida sólida. La administración oral de leptina, con dosis cercanas a la concentración fisiológica presente en leche, puede reducir el consumo de comida en ratas lactantes. De esta manera, la leptina exógena suplida por leche materna puede regular períodos cortos de alimentación en neonatos y ejerce otros efectos biológicos, a un tiempo en el cual el tejido adiposo y el sistema de regulación de apetito son inmaduros. En humanos, el papel de leptina en la leche, en infantes lactantes no es conocido. No se sabe si la cantidad de leptina contenida con leche materna o la falla de esta proteína cuando se usan fórmulas para bebé puedan tener efectos significantes en bebés en desarrollo y si esta pueda tener implicaciones más adelante en la prevención o ser propenso a obesidad en edad adulta (Miralles y col., 2006).

#### II.4.1. Vía orexigénica y anorexigénica de la leptina.

Se ha encontrado que el hipotálamo es el órgano blanco involucrado en la regulación del peso corporal por la leptina. Entre los sitios de expresión elevada del Ob-R son el núcleo arqueado, el núcleo hipotalámico ventromedial, y el núcleo hipotalámico dorsomedial (Bingham, y col., 2008; Myers, 2004), todos implicados en la regulación del comportamiento alimentario y del balance energético (Sánchez, 2005). Dentro de los núcleos hipotalámicos mencionados anteriormente, el núcleo arqueado comprende dos poblaciones de neuronas blanco de la leptina, como se observa en la Figura 5: la primera forma parte de la vía orexigénica (inductora del apetito), la cual está constituida por neuronas que liberan neuropéptido Y, y por neuronas productoras de proteína relacionada con agouti. La segunda, forma parte de la vía anorexigénica (inductora de saciedad), y comprende neuronas secretoras de POMC (propiomelanocortina) y de su subproducto hormona  $\alpha$ -melanocito estimulante, así como por neuronas que liberan transcrito regulado por cocaína y anfetamina (Sánchez, 2005; Myers, 2004; Wang y Chehab, 2006).

La leptina actúa vía Ob-Rb para inhibir las neuronas neuropéptido Y/Proteína relacionada con aguti, y para suprimir la expresión de estos neuropéptidos. De esta

manera la señal de Ob-Rb estimula la producción de neuropéptidos anorexigénicos y reprimir los niveles de péptidos orexigénicos (Myers, 2004; Sánchez, 2005). A la inversa, cuando la acción de la leptina disminuye o es deficiente, el apetito es estimulado vía supresión de neuropéptidos anorexigénicos y por incremento de la expresión de péptidos orexigénicos (Myers, 2004). La leptina es una hormona anorexigénica que juega un papel importante en la regulación central del equilibrio de energía, decremento en la alimentación e incremento en el gasto de energía (Miralles y col., 2006; Myers, 2004). Los individuos obesos tienen niveles elevados de leptina en la circulación pero esta abundancia de leptina falla a medida que se pierde peso, sugiriendo que la mayoría de los humanos obesos representan una forma de resistencia a la leptina (Myers, 2004).

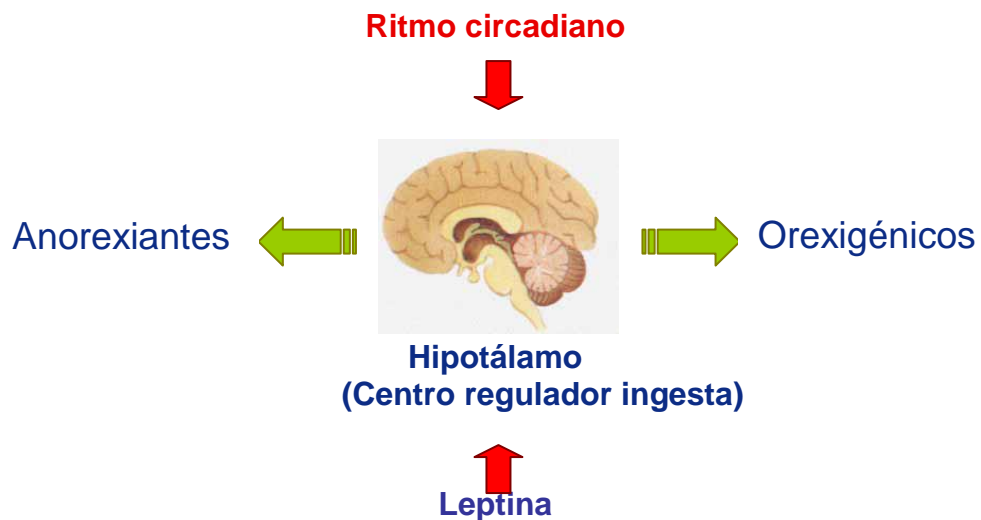


Figura 5. Vía orexigénica y anorexigénica. El núcleo dorsomedial involucra tanto la estimulación como la inhibición de la alimentación a través de la vía orexigénica y la vía anorexigénica respectivamente, y depende, de manera específica, de la leptina (Barreto y col., 2001).

Las neuronas sensibles a leptina del núcleo hipotalámico ventromedial son responsables, al menos en parte, de la iniciación de estas repuestas anorexigénicas para el consumo alto de calorías (Bingham y col., 2008). Los niveles de leptina adecuados sirven para comunicar la saciedad de la energía del

cuerpo al sistema nervioso central para suprimir el consumo de alimentos y permitir el gasto de energía (Leshan y col., 2006; Miralles y col., 2006; Smolinska, 2007).

#### II.4.2. Gen *ob*

El gen responsable de codificar la leptina, es el gen *ob* que está localizado en el cromosoma 7 del ser humano y en el cromosoma 6 del ratón. Cuando se producen mutaciones en *ob*, los animales de experimentación desarrollan el fenotipo típico *ob/ob*. El gen posee 650 kilobases, 3 exones y 2 intrones, mientras que su ARNm posee 4.5 kilobases. Las mutaciones de *ob* son muy raras en los seres humanos. Los individuos afectados desarrollan un cuadro de hiperfagia, obesidad mórbida e hipogonadismo hipotalámico (Sánchez, 2005).

#### II.5. Regulación de la síntesis y liberación de leptina.

La leptina es producida principalmente en los adipocitos, pero también se sintetiza en otros órganos y tejidos, tales como hipotálamo, hipófisis, placenta, músculo esquelético, mucosa gástrica y epitelio mamario aunque en menor cantidad. No se ha demostrado la existencia de depósitos intracelulares de esta hormona, lo que sugiere que hay estímulos que actúan sobre la síntesis, mas no sobre la secreción de la molécula (Sánchez, 2005; Miralles y col., 2006). Los adipocitos de mayor tamaño producen más leptina, mientras que los adipocitos epiloicos secretan menos que los subcutáneos. La cantidad de triglicéridos almacenados en el adipocito es también proporcional a la cantidad de leptina producida por cada adipocito. La secreción de leptina varía de acuerdo al ritmo circadiano. La proteína es secretada en forma de pulsos, con una frecuencia aproximada de un pulso cada 45 minutos. Su concentración aumenta paulatinamente durante el día y alcanza un pico alrededor de la medianoche, para decrecer hasta el inicio de un nuevo ciclo, que comenzaría con la aparición de la luz solar (Sánchez, 2005).

Los glucocorticoides estimulan la síntesis de leptina en adipocitos cultivados (Sánchez, 2005; Myers, 2004), aunque los niveles plasmáticos de cortisol y de leptina conservan una relación inversa a lo largo del tiempo. Los procesos infecciosos, así como algunas citocinas relacionadas (factor de necrosis tumoral e interleucina 1) estimulan la síntesis de leptina, lo que puede conducir a anorexia y a pérdida del apetito en estados patológicos como el cáncer y las infecciones. Las catecolaminas disminuyen la expresión de la leptina, efecto mediado a través de la activación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Sánchez, 2005).

La insulina estimula la expresión de la leptina en adipocitos y por tanto eleva su nivel circulante (Sánchez, 2005). Esta regulación de producción de leptina por insulina y resistencia de la regulación hormonal sugieren que la leptina pueda servir como un indicador de equilibrio de energía, es decir, el aumento de energía almacenada origina aumento de los niveles de leptina. La alimentación provoca un incremento de insulina lo que conlleva un incremento de leptina, mientras que el ayuno induce un incremento de resistencia de regulación hormonal, por lo tanto se origina la disminución de leptina. Verdaderamente, los niveles de leptina en la circulación totalmente correlacionan con adipocitos del cuerpo y cambios en la condición de alimentación aguda (Myers, 2004).

## II.6. Efecto de la leptina en la secreción de insulina.

La insulina es una hormona estimuladora de la producción de leptina, no obstante, en condiciones de sobrenutrición este efecto se invierte. La leptina e insulina son ambas secretadas en proporción de la energía disponible, mientras que la secreción de leptina es indicativa de masa de adipocitos y entonces es de naturaleza crónica, la secreción de insulina refleja una condición nutricional aguda y crónica. La insulina es potencialmente lipogénica y funciona en el SNC para reducir el consumo de nutrientes al igual que la leptina, pero ésta última actúa directamente en células animales para inhibir la secreción de insulina. Como el

peso del cuerpo aumenta, la señalización de la leptina protege a la célula de los efectos adversos de la sobrenutrición. Entonces la glucosa y la homeostasis energética podrían ser consideradas que simultáneamente toman en cuenta los efectos de la glucosa, insulina y leptina en múltiples tejidos (Niswender y Magnuson, 2007).

La célula  $\beta$  censa la disponibilidad de nutrientes, incluyendo glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, por el metabolismo de estas moléculas. Un incremento en la razón de ATP/ADP estimula el cierre del canal  $K_{ATP}$ , lo cual causa despolarización de la membrana, la activación del canal de calcio dependiente de voltaje y exocitosis de insulina. En el contexto de sobrenutrición, la leptina atenúa la secreción de insulina por las células  $\beta$  manteniendo la permeabilidad del canal de  $K_{ATP}$ , de esta manera, se hiperpolarizan células  $\beta$ . Esto podría ocurrir por aumento de la actividad del canal o haciendo al canal menos sensible a cambios en la razón ATP/ADP. Dañada la señalización de leptina en células  $\beta$  podría dirigir a una susceptibilidad aumentada para el efecto negativo de sobrenutrición, con lo cual causa un deterioro en la secreción de insulina (Niswender y Magnuson, 2007).

La presencia de hiperglicemia e hiperfagia en individuos obesos, aún con la presencia de niveles elevados de insulina y leptina en la circulación, sugiere que estos individuos son resistentes a la acción de ambas hormonas. En estudios *in vitro* se han mostrado efectos inhibitorios de leptina en la expresión del gen de insulina y secreción de insulina, además de que el tratamiento con leptina en ratón *ob/ob* invierte la hiperinsulinemia (Morioka y col., 2007).

## II.7. La leptina en la obesidad y en el proceso emocional.

Como se ha mencionado anteriormente la leptina regula el consumo de comida, no obstante, los niveles de leptina no cambian con una sobrecarga de glucosa ni con comidas mixtas. Es tan sólo a partir de 6 horas y más claramente

tras 12 horas de ayuno o sobrealimentación cuando se ven cambios. Parece ser, por tanto, que los niveles de leptina se relacionan más con los cambios a largo plazo. Tanto el exceso de ingesta a largo plazo, como el ayuno prolongado, son capaces de variar los niveles de leptina más allá de lo esperado desde el punto de vista del índice de masa corporal. El descubrimiento de la leptina y el hecho de que su administración a ratones *ob/ob* evitara la obesidad, sentó la esperanza de la posible solución de la obesidad humana si es que ésta es ocasionada por un déficit de leptina. Sin embargo, hay muy pocos casos de déficit congénito de leptina, por el contrario, la obesidad humana parece un estado de resistencia a leptina en la mayoría de los casos (Botella y col., 2001).

La leptina fue originalmente descubierta para regular el peso del cuerpo, sin embargo la localización de receptores de leptina en estructuras límbicas sugiere un papel potencial para leptina en procesos emocionales. Las ratas expuestas a estrés impredecible crónico y rechazo crónico social exhiben bajos niveles de leptina en plasma. Los efectos conductuales de la leptina son acompañados por incremento de activación neuronal en estructuras límbicas, particularmente en el hipocampo. La infusión intrahipocampo de leptina produce un efecto similar propio de antidepresivo, como su administración sistémica. Por el contrario, la infusión de leptina en el hipotálamo disminuye el peso del cuerpo pero no tienen efecto en la conducta. Estos hallazgos sugieren que: (i) la incapacidad de producción y secreción de leptina puede contribuir a fenotipos de tipo estrés crónico y depresión inducida (ii) el hipocampo es una región del cerebro que media la actividad del tipo antidepresiva de la leptina, y (iii) la señalización de leptina elevada en el cerebro puede representar un aporte nuevo para el tratamiento de desórdenes depresivos (Lu y col., 2005).

## II.8. Intervención de la serotonina en la regulación de la alimentación.

En adición a la leptina, la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) también participa en el proceso emocional. La serotonina es un neurotransmisor que



participa en las funciones del cerebro, tales como el proceso emocional y el conocimiento, por modulación de plasticidad sináptica y recientemente descubierto, neurogénesis. La serotonina una vez unida a su receptor, se ha reportado que participa en la regulación de funciones básicas fisiológicas, tales como la secreción de hormonas, ciclo del sueño, control motor, función del sistema inmune, alimentación y balance de energía. Las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central están localizadas en grupos en el núcleo rafé, gris central y formación reticular (Ciranna, 2006).

Uno de los muchos neurotransmisores que pueden tener influencia en la actividad neuronal del núcleo hipotalámico, es la serotonina. El núcleo dorsomedial envía una aportación serotoninérgica muy grande al núcleo hipotalámico en roedores y primates. Previos estudios neurofisiológicos han reportado efectos significantes de serotonina sobre la tasa de disparo de neuronas del núcleo hipotalámico. Se ha encontrado que la serotonina incrementa el índice de activación espontánea en 84% de neuronas del núcleo hipotalámico en cortes de cerebro de rata y que ésta acción es mediada por receptores 5HT<sub>2c</sub> y 5HT<sub>4</sub> que provocan una reducción en la conductancia del potasio. En contraste se han encontrado efectos excitatorios e inhibitorios de la serotonina en índices de activación espontánea de neuronas del núcleo hipotalámico registradas con electrodos extracelulares en cortes de cerebro de ratón. Estos reportes sugieren que la serotonina puede tener múltiples acciones en el núcleo hipotalámico (Shen y col., 2007).

La serotonina entre otros neurotransmisores regulan la frecuencia, duración, tamaño y calidad de las comidas (Albala y col., 2000). Respecto a la selección de macronutrientes, se ha postulado que defectos en la neurotransmisión dependientes de serotonina, provocan trastornos en el ánimo y una apetencia exagerada en el consumo de comidas ricas en carbohidratos; ello ha dado lugar a la descripción de un síndrome denominado “adicción a los carbohidratos”, que se caracteriza por signos de depresión atípica acompañados de urgencia de consumir

alimentos ricos en carbohidratos y obesidad consecuente. El consumo de carbohidratos aumenta la síntesis de serotonina a través de una vía mediada por insulina y aminoácidos (Albala y col., 2000). Mientras la serotonina ha sido implicada en el control del comportamiento de alimentación y peso corporal, las neuronas serotoninérgicas en el núcleo rafe del tallo cerebral contienen receptores de leptina mRNA y puede ser blanco para la acción de leptina (Wang y Chehab, 2006).

### **III.HIPÓTESIS**

La serotonina induce cambios en la marca inmunoreactiva del receptor de leptina en el hipocampo de rata.

## **IV.OBJETIVOS**

### IV.I General

Conocer los cambios en la marca inmunoreactiva del receptor de leptina en el hipocampo de rata inducidos por la administración intraperitoneal de serotonina y leptina.

### IV. II Específicos

- Conocer la marca inmunoreactiva del receptor de leptina en ratas no tratadas.
- Estudiar los cambios en la marca inmunoreactiva de los receptores de leptina en las ratas tratadas con leptina.
- Explorar la marca inmunoreactiva de los receptores de leptina en el hipocampo de ratas tratadas con serotonina.
- Conocer los cambios en la marca inmunoreactiva de los receptores de leptina en el hipocampo de ratas tratadas con serotonina y leptina.
- Comparar las marcas inmunorreactivas de los receptores de leptina observadas en el hipocampo de ratas tratadas con las de las ratas control.

## V.METODOLOGÍA

### V.I Materiales

#### ❖ Químicos

Serotonina

Leptina

Sacarosa

Cámara de CO<sub>2</sub>

Nitrógeno líquido

Paraformaldehído

Tissue tek

Peróxido de hidrógeno

Leche descremada

Buffer PBT

Buffer PBS

Anticuerpo policlonal primario contra Ob-R

Anticuerpo policlonal secundario biotinilado

Avidina

Diaminobencidina

Glicerol

#### ❖ Biológicos

Encéfalo de rata Sprague Dawley

#### ❖ Material y Equipo

Jeringas

Tubos de plástico de 10 mL

Pipetas de plástico

Micropipetas

Portaobjetos

Cubreobjetos  
Papel aluminio  
Cámara húmeda  
Cámara de revelado  
Cronómetro  
Estuche de disección  
Guillotina  
Criostato Leica  
Balanza analítica  
Microscopio de campo claro  
Refrigerador a 4°C

## V.II Método

Ratas Sprague Dawley fueron sometidas a diferentes tratamientos con leptina y serotonina bajo las mismas condiciones para obtener los encéfalos, los cuales se sometieron al método de inmunohistoquímica, en último lugar se observó la inmunotinción de los receptores de leptina en un microscopio de campo claro.

### V.II.1 Tratamiento

Se formaron cuatro grupos integrados por tres ratas adultas macho Sprague Dawley de 150g, como se indica a continuación:

- ◆ Grupo control, no recibieron tratamiento
- ◆ Grupo tratamiento con leptina
- ◆ Grupo tratamiento con serotonina
- ◆ Grupo tratamiento con leptina y serotonina

Las ratas fueron mantenidas a  $22 \pm 2$  °C, con ciclos de luz oscuridad de 12 h por 12 h, en condiciones de humedad controladas y ausencia de ruido, de acuerdo a lo establecido en la guía para el cuidado y uso de animales en el laboratorio. Las ratas se sometieron a un periodo de 10 días de adaptación previo a la aplicación del tratamiento, el cual se administró por vía intraperitoneal a la semana 5 de edad: 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso de leptina, mientras que la dosis de serotonina fue de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso. Después de 1 h de la administración del tratamiento, las ratas se anestesiaron en una cámara de  $\text{CO}_2$ , para posteriormente ser sacrificadas con el uso de la guillotina y obtener los encéfalos. Éstos fueron fijados con paraformalehído al 4%, a continuación se sumergieron en sacarosa al 20% durante 20 min para crioprotegerlos y ser almacenados a  $-70$  °C en Tissue Tek.

#### V.II.2 Método inmunohistoquímico

Se realizaron cortes de 12  $\mu\text{m}$  de grosor del encéfalo de rata, de los encéfalos obtenidos de cada uno de los tratamientos y de las ratas control para ser sometidos al método inmunohistoquímico. Para cada experimento se trabajó con un negativo, un blanco, un control (rata no tratada con los 2 anticuerpos) y los tratamientos (leptina, serotonina y leptina-serotonina). Inicialmente se realizaron tres lavados con PBS de 10 minutos cada uno, se preparó una solución de peróxido de hidrógeno, la cual se agregó a cada laminilla durante 1 h protegiéndolas de la luz, posteriormente se realizaron 3 enjuagues con PBS y se cubrieron las laminillas con leche durante 2 h. Al término de este tiempo se realizaron tres lavados con PBT de 10 min cada uno, posteriormente se adicionó el anticuerpo policlonal primario contra receptor de leptina y se dejaron incubar toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBT, y se agregó el anticuerpo policlonal secundario biotinilado. Después de tres lavados con PBT se adicionó la solución de Avidina a cada laminilla por 30 min. Se efectuaron tres lavados con PBS y se realizó el revelado de las laminillas con la solución formada

por peróxido de hidrógeno, PBS y bencidina. Las laminillas se enjuagaron en una cámara con agua destilada. Finalmente, se secaron las laminillas y se agregó una gota de glicerol cubriéndolas con un cubre objetos. Se realizaron 3 repeticiones de cada experimento formado por ratas diferentes donde el negativo y el blanco se sometieron al mismo procedimiento, exceptuado la adición de los dos anticuerpos (primario y secundario), así como el anticuerpo primario, respectivamente.

### V.II.3 Análisis de la inmunotinción

El análisis de las laminillas se realizó en un microscopio de campo claro con los objetivos 10X y 40X. Inicialmente se analizó el negativo esperando que en éste no se encontrara inmunotinción, posteriormente se analizó el blanco para considerar la inmunotinción inespecífica generada por el anticuerpo secundario y compararla con la inmunotinción del receptor de leptina de las ratas control y la inmunotinción de los cortes de encefálo de rata bajo los diferentes tratamientos.



## VI.RESULTADOS

El análisis de la modificación de la inmunotinción del receptor de leptina inducidos por efecto de la serotonina en hipocampo de rata, se obtuvo mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los cortes de encéfalo de rata utilizados como negativo se trataron de igual manera que los cortes de encéfalo de las ratas que se sometieron a tratamiento con leptina, serotonina o leptina-serotonina, excepto por la adición de los anticuerpos primario o secundario. Los resultados obtenidos en el negativo no presentaron marca inmunoreactiva en la región hipocampal, observándose una coloración gris en el corte de encéfalo de rata como se observa en la Figura 6.

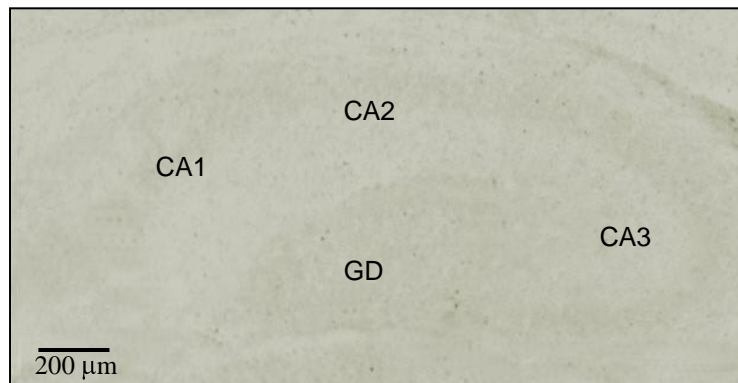


Figura 6. Negativo. Los cortes de encéfalo de rata sin tratamiento y en ausencia de los anticuerpos primario y secundario no presentaron inmunotinción en el hipocampo. Imagen ampliada con el objetivo 2.5X.

Los cortes de encéfalo de rata utilizados como blanco se sometieron a la misma metodología que las muestras problema con la diferencia de que no se adicionó el anticuerpo primario. Estos cortes no presentaron marca inmunoreactiva específica, no obstante, presentaron una ligera tonalidad café en todo el corte de encéfalo como se observa en la Figura 7.

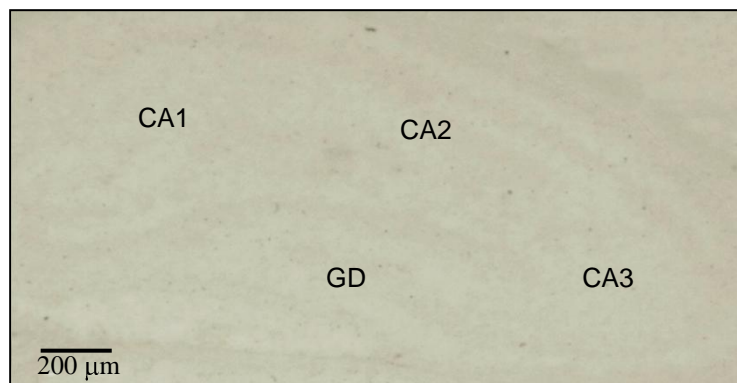


Figura 7. Blanco. En los cortes de encéfalo de rata usados como blanco se observó una ligera tonalidad café en todo el corte sin inmunotinción en el hipocampo. Imagen ampliada con el objetivo 2.5X.

El análisis de la inmunotinción de los cortes de encéfalo de las ratas sin tratamiento, es decir, de las ratas control, presentaron una tonalidad café en todo el corte del encéfalo, lográndose distinguir una ligera inmunotinción en las células del hipocampo (Figura 8).

En los cortes de encéfalo de rata sometidos a tratamiento con leptina presentaron mayor marca inmunoreactiva que los cortes de encéfalo de rata control. El giro dentado presentó mayor marca inmunoreactiva que las demás regiones del hipocampo. Mientras que las regiones CA1 y CA2 presentaron una marca inmunoreactiva similar entre ellas, pero mayor a la obtenida en la región CA3 como se observa en la Figura 9.

Los resultados obtenidos en los cortes de encéfalo de rata bajo tratamiento con serotonina, sometidos a inmunotinción para receptores a leptina, presentaron una disminución en la señal respecto a las que fueron tratadas con leptina pero mayor a la inmunotinción observada en los cortes de encéfalo de rata control. El giro dentado, las regiones CA1, CA2, y CA3 mostraron la misma intensidad de inmunotinción en las células del hipocampo (Figura 10).

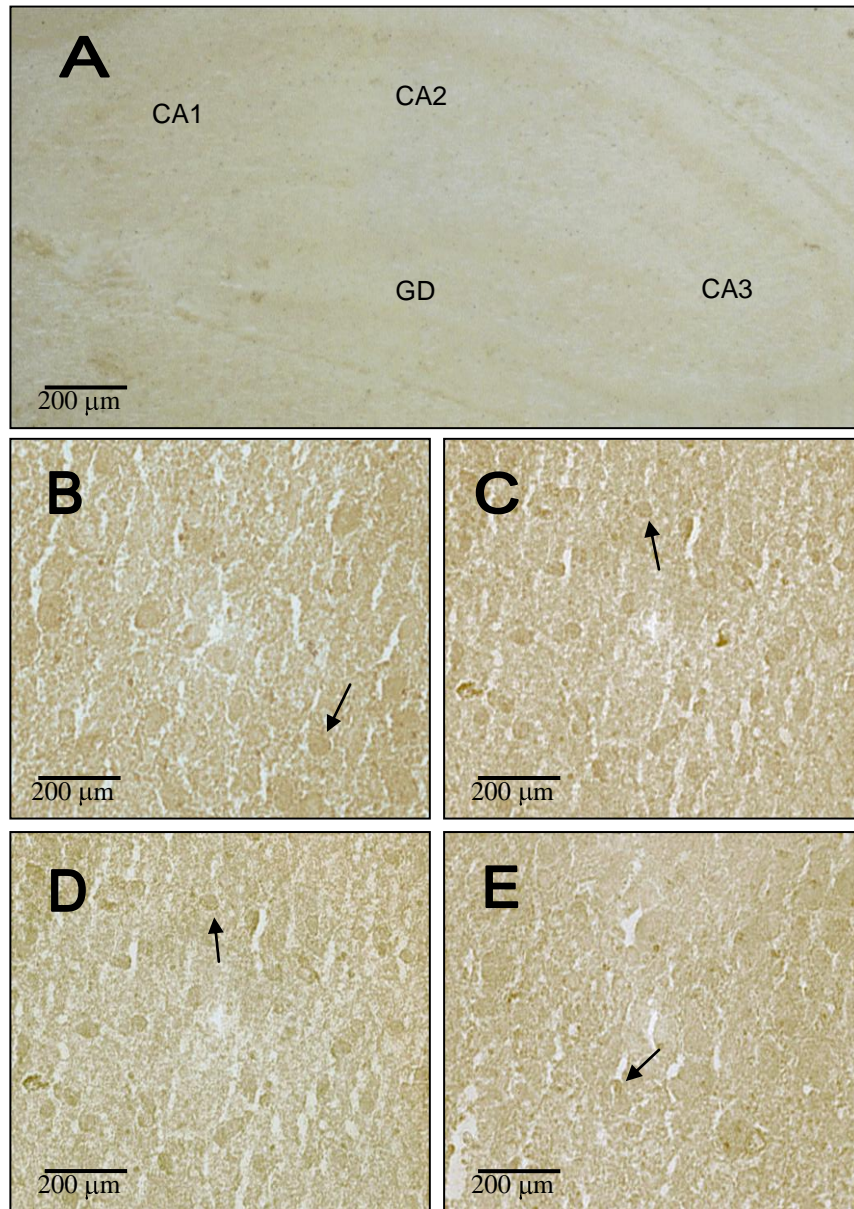


Figura 8. Inmunotinción contra receptores a leptina en hipocampo de las ratas control. Se observa ligera inmunotinción en el hipocampo (A). Imagen ampliada con el objetivo 2.5X. El giro dentado (B) y las regiones CA1, CA2 y CA3 (C, D y E respectivamente) presentaron la misma marca inmunoreactiva. Imágenes ampliadas con el objetivo 40X.

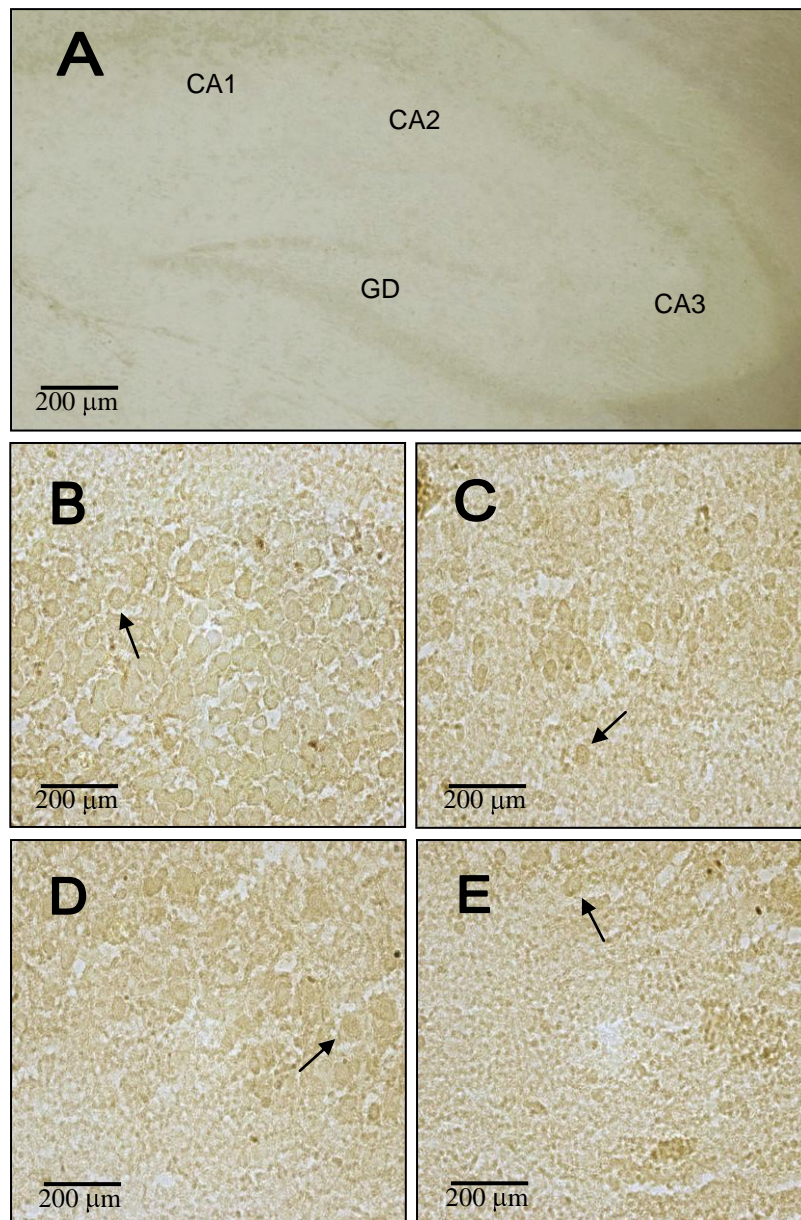


Figura 9. Inmunotinción contra receptores de leptina en hipocampo de ratas tratadas con leptina. Se observó una inmunotinción mayor en el hipocampo (A) a la observada en la rata control. Imagen ampliada con el objetivo de 2.5X. El giro dentado (B) presentó mayor marca inmunoreactiva que la región CA1, CA2 y CA3 (C, D y E respectivamente), mientras que en ésta última la marca fue menor que en las regiones CA1 y CA2. Imágenes ampliadas con el objetivo 40X.

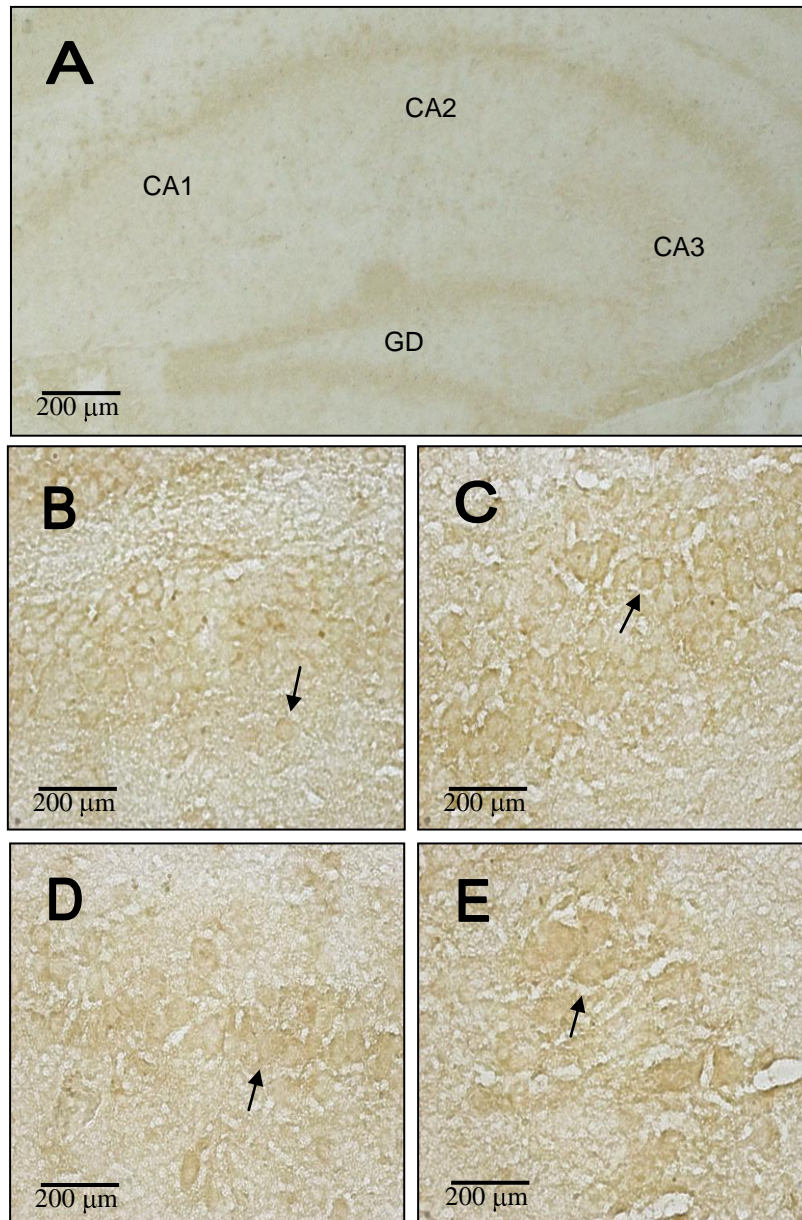


Figura 10. Inmunotinción contra receptores a leptina en hipocampo de ratas tratadas con serotonina. La inmunotinción obtenida en el hipocampo (A) fue mayor que la obtenida en la rata control. Imagen ampliada con el objetivo 2.5X. El giro dentado, CA1, CA2 y CA3 (B, C, D y E respectivamente) presentaron la misma inmunotinción. Imágenes ampliadas con el objetivo 40X.

En los cortes de encéfalo de ratas tratadas con serotonina y leptina la inmunotinción hipocampal fue mayor que en las ratas control y similar a las ratas tratadas con leptina como se observa en la Figura 11. Las distintas regiones del hipocampo analizadas mostraron la misma inmunotinción.

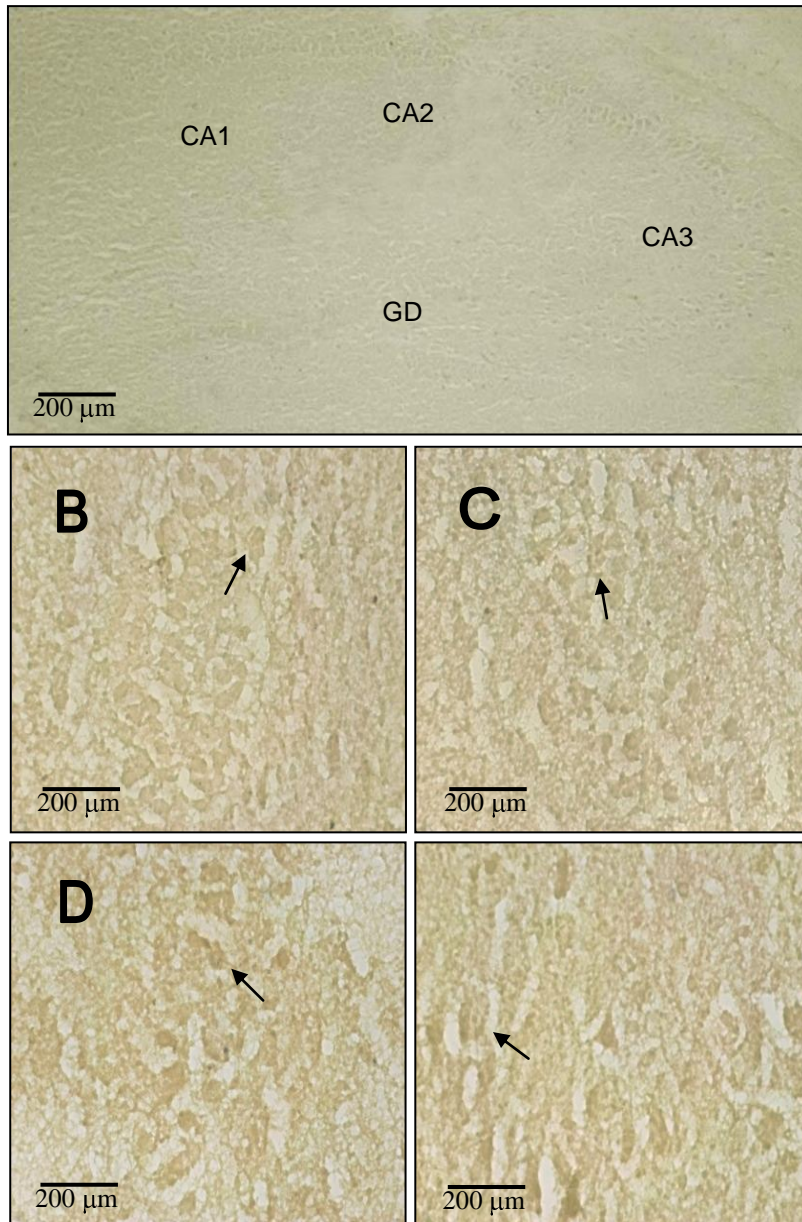


Figura 11. Inmunotinción contra receptores a leptina en hipocampo de ratas tratadas con leptina-serotonina. La inmunotinción obtenida en el hipocampo (A) se incrementó con respecto a las ratas control. Imagen amplificada con el objetivo 2.5X. El giro dentado y las regiones CA1, CA2 y CA3 (B, C, D y E respectivamente) presentaron la misma inmunotinción. Imágenes amplificadas con el objetivo 40X.

## VII.DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el análisis de la inmunotinción obtenida a partir del estudio de cortes de encéfalo de rata bajo la técnica de inmunohistoquímica, para determinar la modificación de receptores de leptina por efecto de la serotonina, en el negativo no se observó inmunotinción en el hipocampo, ya que ni el anticuerpo primario ni el secundario, contra receptores a leptina fueron agregados, estos resultados indican que no hay marca inespecífica por efecto de los reactivos de revelado.

En los cortes de encéfalo de rata utilizados como blanco no se observó marca inmunoreactiva en el hipocampo debido a que no se adicionó el anticuerpo primario, que es específico para los receptores de leptina, esto nos muestra que el anticuerpo secundario tampoco originó señal inespecífica.

El hipocampo de los cortes de encéfalo de rata control (sin tratamiento) mostró una ligera inmunotinción manifestando la distribución normal de los receptores de leptina en ausencia de los tratamientos aplicados, éstos resultados coinciden con reportes anteriores, donde se ha detectado inmunoreactividad del receptor Ob-Rb en el hipocampo (Ur y col. 2002; Harvey y col., 2006; Carlo y col., 2007). La presencia de receptores de leptina en el hipocampo puede ser asociada a que esta región del sistema límbico tiene como funciones el aprendizaje y la memoria, y la leptina favorece la potenciación a largo plazo (Sanchez, 2005). La leptina fue originalmente descubierta para regular el peso del cuerpo, sin embargo, la localización de receptores de leptina en estructuras límbicas sugiere un papel potencial de la leptina en procesos emocionales. De esta manera, el hipocampo es una región del cerebro que media la actividad del tipo antidepressiva de la leptina (Lu y col., 2005; Jiménez y col. 2009; Sanchez, 2005). No obstante, el papel de la leptina en la depresión está inconcluso, ya que se han tenido reportes donde personas con depresión mayor presentan altos niveles de leptina en suero, mientras que en otras personas se ha observado lo contrario (Jiménez, y col., 2009). De tal manera que, también se ha encontrado que pacientes con problemas

depresivos muestran niveles bajos de leptina (Lu y col., 2005). Una teoría propuesta recientemente es que los niveles insuficientes de leptina y resistencia a la misma son asociados con desórdenes en el humor (Jiménez y col., 2009).

La inmunotinción obtenida en el hipocampo de la rata control permite comparar la inmunotinción obtenida al aplicar tratamiento con leptina, serotonina o leptina-serotonina a las ratas, determinando la modificación de los receptores a leptina.

En los cortes de encéfalo de ratas tratadas con leptina se observó un aumento cualitativo en la inmunotinción respecto a la observada en las ratas control. En las regiones CA1 y CA2 se observó una inmunotinción similar pero menor a la observada en el giro dentado, mientras que en la región CA3 se observó la marca inmunoreactiva menor que en las demás regiones analizadas. Los resultados obtenidos son consistentes con lo observado por Scott y col., en el 2009, quienes localizaron altos niveles de expresión del receptor de leptina de forma larga en el estrato granular del giro dentado en ratas tratadas con leptina administrada periféricamente. En dicho estudio observaron una marca substancial en las regiones CA2 y CA3. En contraste, la expresión en CA1 fue muy débil. Sin embargo, los resultados obtenidos por Harvey y col., (2006), coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo, al encontrar que las regiones CA1/CA3 y giro dentado muestran inmunoreactividad del receptor de leptina. Se ha encontrado que los receptores a leptina son sensibles a cambios en las concentraciones de leptina plasmática. Yorio y col., en el 2008 observaron que a concentraciones bajas de leptina (0.3 ng/mL) la expresión de receptores se redujo y a concentraciones elevadas de la hormona (30 a 300 ng/mL) se presentó un aumento en la expresión de receptores. De tal manera que, la expresión de receptores de leptina incrementa cuando las ratas reciben tratamiento agudo con la hormona. Lo que sugiere que la leptina esta disponible para modular la expresión de su propio receptor. Por lo que existe una correlación positiva entre la expresión



de leptina y la expresión del receptor Ob-R (Ishikawa y col., 2006, Leininger y col., 2009).

La inmunotinción aumentada de receptores de leptina en el hipocampo de ratas tratadas con serotonina con respecto a las ratas control, indica que al igual que la leptina, la serotonina incrementa la inmunotinción de los receptores Ob-R. Esto se debe a que la serotonina se halla distribuida en regiones del encéfalo que pueden afectar la conducta, sobre todo en el hipotálamo y el sistema límbico. Los receptores 5HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> se encuentran en neuronas del hipocampo acoplados a adenilato ciclasa e incrementan los niveles de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), (Ciranna, 2006; Bradley, 2005), el cual activa la proteína cinasa A (Bradley, 2005; Deng y col., 2007). En 1996, Kosaki y col., observaron que las vías de señalización que resultan en la activación de la proteína cinasa A regulan la expresión del gen de leptina en adipocitos. Considerando lo anterior se puede proponer que la activación de los receptores a serotonina, incrementaron la concentración de cAMP y este incrementó leptina y con ello la expresión del receptor.

El aumento en la inmunotinción de los receptores de leptina por efecto de la serotonina también podría atribuirse a que la serotonina eleva el nivel de insulina en el suero de los ratones. Recordando que la insulina estimula la expresión de la leptina en adipocitos y por tanto eleva su nivel circulante (Sánchez, 2005). Se ha observado con anterioridad que la administración periférica de serotonina incrementa los niveles de insulina en el ratón y como consecuencia de ello, hay una elevación en el nivel de leptina (Yamada y col., 2003).

Quizá la inmunoreactividad menor observada en el hipocampo de las ratas tratadas con serotonina respecto a las ratas tratadas con leptina, se deba a que en el hipocampo también se encuentran receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Una de las funciones de este receptor a serotonina es reducir la actividad de la adenilato ciclasa y por lo tanto disminuir la formación de cAMP (Bradley, 2005; Ciranna, 2006), teniendo de

esta manera un efecto contrario al obtenido con los receptores que estimulan la formación de cAMP y posterior estimulación de la expresión de leptina.

Los resultados obtenidos al aplicar tratamiento con serotonina y leptina en conjunto, mostraron inmunotinción similar a la obtenida en el tratamiento con leptina, esto se debe a lo referido anteriormente, la leptina estimula la expresión de sus receptores (Yorio y col., 2008; Ishikawa y col., 2006, Leininger y col., 2009) y la serotonina incrementa los niveles de leptina mediante la vía de activación de receptores de serotonina acoplados a adenilato ciclasa produciendo un aumento en el cAMP y la posterior activación de la proteína cinasa A (Kosaki y col. 2006; Deng y col., 2006; Ciranna, 2006; Bradley, 2005), además de que la serotonina eleva el nivel de insulina y a su vez esta estimula la expresión de leptina.

Sin embargo, debido a que los tratamientos aplicados fueron de tan solo una hora, se consideraría que el tiempo para que se dé el proceso de estimulación del gen de receptor de leptina, por efecto de la leptina, es corto. Por lo que se podría atribuir el aumento en la inmunotinción de receptores de leptina en las neuronas del hipocampo, a liberación de receptores almacenados intracelularmente. Debido a que bajo condiciones normales, solo entre el 5 y 25% del total de las isoformas Ob-R son localizadas en la superficie celular, con la mayoría contenida en “pools” intracelulares (Fruhbeck, 2006; Belouzard y col., 2004; Barr y col., 1999).

No quedaría descartada la posibilidad de estimulación del gen que codifica el receptor de leptina ya que, el transporte de receptores sintetizados nuevamente alcanza la superficie celular en menos de 1 h después de su síntesis (Belouzard y col., 2004). Quedando abierta la posibilidad del aumento de receptores en la superficie celular como consecuencia de la estimulación de los genes implicados.

Podría esperarse una inmunotinción mayor de los receptores Ob-R al darse tratamiento con leptina y serotonina respecto a la inmunotinción de receptores en el hipocampo observada en el tratamiento con leptina, ya que los resultados emitidos

con ambos tratamientos leptina y serotonina administrados por separado, indicaron mayor inmunotinción de receptores Ob-R en el hipocampo que la observada en la rata control. Al no obtener tal resultado podría deberse a la existencia de receptores Ob-R cortos (Ob-Ra, Ob-Rc, y Ob-Rd), los cuales son capaces de activar cascadas de señalización, pero su función primordial es la internalización y degradación de la leptina (Vazquez, V. M., 2006; Sanchez, 2005). Disminuyendo de esta manera, la cantidad de leptina disponible para inducir la expresión de su receptor.

## **VIII.CONCLUSIONES**

El hipocampo de rata presenta receptores a leptina en las regiones CA1, CA2, CA3 y giro dentado.

La leptina incrementa la inmunotinción de los receptores a leptina en el hipocampo de rata.

La serotonina incrementa la inmunotinción de los receptores a leptina en las neuronas del hipocampo.

La administración conjunta de leptina y serotonina incrementa la inmunotinción de los receptores a leptina en el hipocampo de rata.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Albala, C.,** Kaín, J., Burrows, R., Díaz, E. **2000.** *Obesidad: Un desafío pendiente.* Editorial Universitaria, Chile: 48 y 49.
- Arias, J.,** Melean, E., Valero, N., Pons, H., Chacín, B. L., Larreal, Y., Bonilla, E. **2003.** Efecto de la Melatonina en la Proliferación Linfocitaria y la Producción de Interleucina 2 (IL-2) e Interleucina 1 Beta (IL-1b) en Esplenocitos de Ratones. *Investigación Clínica.* Vol. 4: 41-50.
- Barr, V.,** Lane, K., Taylor, S. **1999.** Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 274: 21416–21424
- Barreto, L.,** Munar, F., Acosta, E., Terrot, A. **2001.** *Obesidad: fisiología de la ingesta (Primera parte).* Revista Colombiana de Cirugía Plástica y Reconstructiva. Vol. 7: 46-51.
- Belouzard, S.,** Delcroix, D., Rouillé, Y. **2004.** Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry.* Vol. 279: 28499–28508.
- Bingham, N.,** Anderson, K., Reuter, A. L., Stallings, N. R., Parker, K. L. **2008.** Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology.* Vol. 149: 2138-2148.
- Bonet, L. T.** **2008.** <http://mural.uv.es/teboluz/index2.html#nombre36>
- Botella, C. I.,** Lledín B. Valero, G. M., Varela, D. **2001.** Leptina: implicaciones fisiológicas y clínicas. *Anales de medicina interna.* Vol.18:152-160.
- Bradley, W. G.,** Daroff, R. B., Fenichel, G. M., Jankovic, J. **2005.** *Neurología clínica. Diagnóstico y tratamiento.* 4ª ed. Elsevier. España: 896-897.
- Carlo, A. S.,** Meyer, W., Williams, L. **2007.** Early developmental expression of leptin receptor gene and [125I] leptin binding in the rat forebrain. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* Vol. 33:155-63.

- Ciranna, L. 2006.** Serotonin as a Modulator of Glutamate- and GABA-Mediated Neurotransmission: Implications in Physiological Functions and in Pathology. *Current Neuropharmacology*. Vol. 4: 101-114.
- Deng, P. Y., Poudel, S., Rojanathammanee, L., Porter, J., and Lei. S. 2007.** Serotonin inhibits neuronal excitability by activating two-pore domain K channels in the entorhinal cortex. *Molecular pharmacology*. Vol. 72: 208-218.
- Fruhbeck, G. 2006.** Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journalist*. Vol. 393: 7–20.
- Ganong, W. F. 2006.** Fisiología médica. 20ª edición. Manual moderno, México: 97, 225-227.
- Guyton, A. 2001.** Tratado de fisiología médica. 10ª ed., Mc Graw Hill, México: 826-827.
- Harvey, J., Solovyova, N., and Irving, A. 2006.** Leptin and its Role in Hippocampal Synaptic Plasticity. *Progress in Lipid Research*: Vol. 45: 369–378.
- Harvey, J. 2007.** Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *Journal of Neurochemistry*. Vol. 100: 307-313.
- Ishikawa, M., Kitayama, J., Nagawa, H. 2006.** Expression pattern of leptin and leptin receptor (OB-R) in human gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. Vol. 12: 5517-5522
- Jiménez, I., Sobrino, T., Rodríguez, M., Pouso, M., Cristobo, I., Sabucedo, M., Blanco, M., Castellanos, M., Leira, R., Castillo, J. 2009.** High serum levels of leptin are associated with post-stroke depression. *Psychological Medicine*. Vol. 39: 1201-1209.
- Kosaki, A., Yamada, K., and Kuzuya, H. 1996.** Reduced expression of the leptin gene (ob) by catecholamine through a G(S) protein-coupled pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes*. Vol. 45: 1744-1749.
- Leininger, G. M., Jo, Y. H., Leshan, R. L., Louis, G. W., Yang, H., Barrera, J. G., Wilson, H., Opland, D. M., Faouzi, M. A., Gong, Y., Jones, J. C., Rhodes, C. J., Chua, S. Jr., Diano, S., Horvath, T. L., Seeley, R. J., Becker, J. B., Münzberg, H., Myers, M. G. Jr. 2009.** Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral

hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metabolism*. Vol. 10: 89-98.

**Leshan, R., Björnholm, M., Münzberg, H., Myers, MG. Jr. 2006.** Leptin Receptor Signaling and Action in the Central Nervous System. *Obesity*. Vol. 14: 208-212.

**Lu, X. Y., Kim, C. S., Frazer, A. Zhang, W. 2005.** Leptin: A potential novel antidepressant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 103: 1593–1598.

**Miralles, O. Sánchez, J., Palou, A., Pico, C. 2006.** A Physiological Role of Breast Milk Leptin in Body Weight Control in Developing Infants. *Obesity*. Vol. 14: 1371–1377.

**Morioka, T., Asilmaz, E., Hu, J., Dishinger, J., Kurpad, A., Elias, C. F., Li, H., Elmquist, J. K., Kennedy, R. T., Kulkarni, R. N. 2007.** Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects  $\beta$  cell growth and function in mice. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 117: 2860-2868.

**Myers, M. 2004.** Leptin Receptor Signaling and the Regulation of Mammalian Physiology. *The Endocrine Society*. Vol. 59: 287-304.

**Netter, F. H. 2006.** Sistema endócrino y enfermedades metabólicas. Tomo 4. Masso. España: 36.

**Niswender, K., Magnuson, M. A. 2007.** Obesity and the  $\beta$  cell: lessons from leptin. *Journal of Clinical Investigation*. Vol. 117: 2753 – 2756.

**O'Malley, D. 2007.** Leptin promotes rapid dynamic changes in hippocampal dendritic morphology. *Molecular and Cellular Neurosciences*. Vol. 35: 559–572.

**Sadaf, F. Wangensteen, T., Collins, F., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J. M., Lank, M., Bottomley, B., Lopez, F. J., Ferraz, A. I., Dattani, M. T., Ercan, O., Grethe M. A., Retterstol, L., Stanhope, R., Edge, J. E., McKenzie, S., Lessan, N., Ghodsi, M., De Rosa, V., Perna, F., Fontana, S., Barroso, I., Undlien, D. E., O'Rahilly, S. 2007.** Clinical and Molecular Genetic Spectrum of Congenital Deficiency of the Leptin Receptor. *New England Journal of Medicine*. Vol. 356: 237-47.

**Sánchez, J. 2005.** Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia médica*: Vol. 36: 50-59

- Scott**, M. M., Lachey, J. L., Scott, M. S., Lee, C. E., Elias, C. F., Friedman, J. M., Elmquist, J. K. **2009**. Leptin targets in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*. Vol. 514: 518–532.
- Shanley**, L. J., O'Malley, A. J., Irving, M. L. Ashford and Harvey, J. **2002**. Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *Journal of Physiology*. Vol. 545: 933-944.
- Shen**, K. Kozell, L. B., Johnson, S. **2007**. Multiple conductances are modulated by 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in rat subthalamic nucleus neurons. *Neuroscience*. Vol. 148: 996–1003.
- Smolinska**, N. **2007**. Leptine gene and protein expression in the trophoblast and uterine tissues during early pregnancy and the oestrous cycle of pigs. *Journal of Physiology and Pharmacology*. Vol. 58: 563-581.
- Tortora**, G., Reynolds, G. S. **2006**. *Principios de anatomía y fisiología*. 9ª ed., Oxford, México: 452, 467, 468.
- Ur**, E., Wilkinson, D. A., Morash, B. A., Wilkinson M. **2002**. Leptin immunoreactivity is localized to neurons in rat brain. *Neuroendocrinology*. Vol. 75: 264-72.
- Vazquez**, V. M., **2006**. Señalización de la leptina. *Educación bioquímica*: Vol. 25: 50-54.
- Wang**, B., y Chehab, F. **2006**. Deletion of the serotonin 2c receptor from transgenic mice overexpressing leptin does not affect their lipodystrophy but exacerbates their diet-induced obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 351: 418–423.
- Wiwanitkit**, V. **2007**. Interaction between leptin and leptin receptor in gastric carcinoma: Gene ontology analysis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. Vol. 99: 201-205.
- Yamada**, J., Sugimoto, Y., Ujikawa, M., Goko, H., Yagura, T. **2003**. Hyperleptinemia elicited by the 5-HT precursor, 5-hidroxitriptofano en ratones: involvement of insulin. *Life sciences*. Vol. 73: 2335-2344.
- Yorio**, M. P., Bilbao, M. G., Pustovrh, M. C., Prestifilippo, J. P., and Faletti, A. G. **2008**. Leptin modulates the expression of its receptors in the hypothalamic–



pituitary–ovarian axis in a differential way. *Journal of Endocrinology*. Vol. 198: 355–366.

**Yuste, G. A. 2009.** <http://www.peatom.info/salud/117230/papel-de-los-receptores-metabotropicos-en-la-formacion-de-la-memoria/>