



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

***ESTUDIO DEL EFECTO DEL KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE
ENERGÉTICO Y EL ESTADO INFLAMATORIO HIPOTALÁMICO EN
RATONES OBESOS***

TESIS DE LICENCIATURA

*Que para obtener el Título de “Químico Farmacobiólogo”
PRESENTA*

PEDRO ALBERTO ROMERO JUÁREZ

Ante el Comité Sinodal

- Presidente D.C. Rosalío Mercado Camargo, Profesor Investigador de la Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH.
- Vocales D. C. Esperanza Meléndez Herrera, Investigadora del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, UMSNH.
- D.C. María de la Luz Torner Aguilar, Investigadora del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, IMSS.

Director de tesis
D.C. OMAR GUZMÁN QUEVEDO

Septiembre del 2020

A mi familia

RESUMEN

La obesidad resulta de una ruptura del equilibrio energético del organismo, conocido como balance energético, es decir el consumo de calorías supera a las calorías gastadas. Dicho equilibrio energético es regulado por el cerebro, a través de una participación crítica del hipotálamo, en el cual se detecta el nivel de energía del organismo interpretando señales hormonales y nutrientes a través del sistema de las melanocortinas, induciendo respuestas de apetito o anorexia. Este sistema puede ser alterado por un consumo excesivo de grasas saturadas, las cuales llevan a una activación de células microgliales del hipotálamo, provocando una inflamación y consecuente desarrollo de obesidad. Por otro lado, el kaempferol, un compuesto de tipo flavonoide presente en una gran cantidad de alimentos vegetales, ha mostrado capacidad de regular el metabolismo energético y propiedades antiinflamatorias. En este sentido, el objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar el efecto del tratamiento crónico con kaempferol sobre el balance energético y estado inflamatorio hipotalámico en ratones obesos. Usando técnicas farmacológicas y comportamentales determinamos si el tratamiento intraperitoneal crónico con kaempferol modula el consumo de alimento, cambio de peso corporal y la eficiencia alimentaria en ratones obesos alimentados con una dieta hiperlipídica. Mejoras en la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina fueron también evaluadas en dichos animales. Además, se analizó el estado inflamatorio del hipotálamo, midiendo la densidad y el nivel de activación de la microglía, después del tratamiento con kaempferol. Finalmente, se verificó si la administración intracerebroventricular aguda de kaempferol es capaz de modular el balance energético. Los resultados mostraron que el tratamiento crónico con kaempferol reduce el peso corporal, disminuyendo la eficiencia alimentaria y mejora el metabolismo de la glucosa. Estos beneficios fueron acompañados por una disminución de los niveles de activación de la microglía en el núcleo arqueado del hipotálamo. De manera interesante, los efectos ejercidos por kaempferol sobre el balance energético fueron reproducidos cuando este fue administrado centralmente. Este trabajo muestra que el kaempferol promueve una pérdida de peso corporal a través de la regulación del balance energético, por disminución de la eficiencia alimentaria. Promueve también una reducción del estado inflamatorio del hipotálamo, una condición responsable del estado de obesidad. La demostración de que la administración central regula el balance energético sugiere que los beneficios metabólicos observados pueden deberse en parte a la acción antiinflamatoria del kaempferol ejercida sobre el hipotálamo. Globalmente, este trabajo valida al kaempferol como una alternativa terapéutica para el combate de la obesidad y enfermedades asociadas, enfocándose en sus efectos sobre el hipotálamo.

palabras clave: obesidad, balance energético, inflamación hipotalámica, núcleo arqueado, flavonoides, kaempferol

ABSTRACT

Obesity is a major public health problem worldwide since it is closely related to other medical conditions such as type 2 diabetes. Obesity results from a disruption in the energy balance in the organism, that is, caloric intake exceeds the calories expended. Energy balance is regulated by the brain, the arcuate nucleus of the hypothalamus playing a critical role. The organism's energy level is detected by interpreting hormonal and nutrient signals through the melanocortin system, inducing appetite or anorexia responses. This system can be altered by excessive consumption of saturated fats, which leads to an activation of microglial cells of the hypothalamus, causing inflammation and consequent development of obesity.

On the other hand, kaempferol, a flavonoid type compound present in a large number of plant-based foods, has shown the ability to regulate energy metabolism and anti-inflammatory properties. Consequently, the objective of this thesis was to study the effect of chronic kaempferol treatment on the energy balance and hypothalamic inflammatory status in obese mice. Using pharmacological and behavioral approaches, we determined if chronic intraperitoneal treatment with kaempferol modulates food intake, body weight change, and feed efficiency in obese mice fed a high fat diet. Effects on glucose tolerance and insulin sensitivity were also evaluated in these animals. In addition, the inflammatory state of the arcuate nucleus was analyzed by measuring the density and activation levels of the microglia, after chronic treatment with kaempferol. Finally, it was verified if the acute intracerebroventricular administration of kaempferol was able to modulate the energy balance. The results showed that chronic treatment with kaempferol improves glucose metabolism, and reduces body weight by decreasing feed efficiency. These benefits were accompanied by a significant decrease in the levels of activation of the microglia in the hypothalamic arcuate nucleus. Interestingly, the effects exerted by kaempferol on the energy balance were reproduced when it was centrally administered.

The data generated in this work show that kaempferol promotes a loss of body weight through the regulation of energy balance, due to a decrease in feed efficiency. It also promotes a reduction in the inflammatory state of the hypothalamus, a condition responsible for the state of obesity. The fact that its central administration regulates the energy balance suggests that the observed metabolic benefits may be due to the anti-inflammatory action of kaempferol exerted on the hypothalamus. Globally, this work validates kaempferol as a potential therapeutic alternative to combat obesity and obesity-associated diseases, focusing its effects at the hypothalamic level.

“Todo lo que el hombre puede ganar al juego de la peste y de la vida es el conocimiento y el recuerdo”

Alberto Camus “La Peste”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mis sinodales por el valioso tiempo que se tomaron para revisar el manuscrito de este trabajo; sus correcciones contribuyeron sin duda a la calidad de esta tesis.

De igual manera un reconocimiento y agradecimiento a mis tutores por ser un pilar fundamental en mi formación académica. Gracias por acompañarme en esta expedición con su apoyo científico, intelectual e, inclusive, emocional; sin él este trabajo no habría sido posible. Al Dr. Omar Guzmán Quevedo, que aunque ha llevado un camino difícil jamás olvidó su labor como persona y como científico haciendo lo imposible por guiarme dentro de la ciencia, el mundo social, e incluso otros ámbitos como el arte y la literatura. Reconozco que no soy un estudiante fácil de tratar, pero señor asesor usted ha logrado despertar en mí la curiosidad científica por lo cual tiene mi respeto y admiración. Sin más le doy las gracias por su apoyo científico, pero también por brindarme su amistad. De igual forma agradezco a la Dra. María de la Luz Torner Aguilar por ser una gran persona, de una amabilidad sin igual, con un gran corazón y enseñanzas que transmitir, una persona que me guiado en este mundo científico sin limitar mi curiosidad. Su *expertise* fue indispensable para realización de este trabajo. Al equipo de investigación del D.C. Raul Manhães y la D.C. Ana Elisa Toscano de la “Universidade Federal de Pernambuco”(Brasil) por su importante colaboración internacional para la realización de este trabajo. Les agradezco personalmente a ustedes por su amistad, finos profesores.

A mis compañeros y amigos dentro del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) mis agradecimientos por su apoyo en mi estancia dentro del Laboratorio de Neuroendocrinología, así como por brindarme una amistad y ayuda en los experimentos que realice dentro del centro. Mercedes y Luis estudiantes de doctorado del Dr. Omar y la Dra. Luz, respectivamente, agradezco sus grandes aportaciones a este trabajo. Así de igual manera a las amistades que formé en este centro: Roberto, Edel, Vanessa, Saraí, Dora, Alicia, Angélica y Arturo, gracias por compartir lo más valiosos del ser humano como lo es su tiempo llegando a formar grandes anécdotas. Al igual agradezco al grupo de trabajo compartido del Dr. Omar y la Dra. Luz, los chicos que están dentro por su tenacidad y su amistad y grandes debates científicos, gracias: Raúl, Scarlette, Marycarmen, Adriana, Karen, Emanuel y Diego. Gracias por su tiempo y compañía.

Agradezco a mis amigos de *Shikuamis Club Basquetbol* y ahora con el grupo *MenanhakuaTumbiecha*; pareciera ayer cuando llegué a las puertas de una cancha que parecía ser una cancha deportiva más, no pude haber estado más equivocado lo que al principio inicio como una actividad extra escolar, se convirtió en una cancha que cultiva una de las grandes amistades que pude tener. Recuerdo que llegamos de diferentes barrios, que por aquellos tiempos mantenían grandes rivalidades, y Sebas, el íntimo camarada de muchos, logró unirnos en un solo

equipo. Y ahora que muchos se han tenido que ir a buscar una mejor vida, añoramos su presencia, al mismo tiempo que estamos al pendiente de su regreso. Nosotros jamás nos llamamos por nuestro nombre de pila, así que no hay por qué romper esa bonita tradición, así que los citare por su nombre de cancha: lengua, pipo, maclusqui, chaleco, tapón, yordi, el tuko, machicho, garza, chente caba, tiotis, nachos ychavalero, gracias por ser parte fundamental de mis vivencias buenas, pero también hemos aprendido a estar con esta amistad en los días malos. Aquí también agrego mi amigo Manuel por ser un gran amigo de la Universidad casi parece que estuvo en esta cancha. Por todo esto agradezco su amistad y que sigamos sembrando y cosechando cosas buenas que ayuden a nuestra comunidad.

Para cerrar como de ser, con un gran broche de oro, en mis agradecimientos al soporte fundamental de mi ser. Un gran reconociendo a mi familia, que como buena familia mexicana e indígena es muy amplia que no acabaría de mencionar a todos tíos, tías, primos y primas. Resaltando a mis hermanos por convivir toda su vida conmigo, su apoyo y fortalecimiento incondicional, siempre están ahí para mí, y quiero que esto sea mutuo, siempre estaré para ustedes. He aprendidos mucho de cada uno en estos años de Miguel, su actitud rebelde y valiente ante la vida, aprovechas el tiempo por qué dices que vida solo una, pero aun así eres una persona de gran corazón capaz de ver las cosas sin un tabú social, y que todos somos parte de un todo. De mi hermana Cinthya gracias por compartir de ti tus experiencias en una vida que es complicada y que has hecho una gran familia de la cual agradezco que compartas con nosotros esos destellos de luz que son mis sobrinas Ximena y Betzy, una niñas que con la misma sangre son de personalidades tan diferentes, una seria pero siempre con un razonamiento e entendimiento de las cosas de la vida y un talento para la música excepcional por ende la mayor de todas las sobrinas. Otra con un carisma nato, siempre sonriendo o llorando, no se sabe, es impredecible como la princesa caramelo. Agradezco por dejarme ser parte de esto a igual que a mi cuñado Alex por su esfuerzo constante para sacar a tu familia adelante y ser un ejemplo junto con mi hermana de un matrimonio. Marcos nombre de grandes personajes históricos de hombres fuertes que han sobrevivido a las adversidades de la vida mis padres no pudieron buscar un mejor nombre para la persona que eres, un hombre de suma bondad y sencillez jamás he visto una gota de maldad en tu mirada, ahora ya con tu propia familia tienes mucho que enseñarme en este camino que aunque eres menor que yo, diste un paso de fe hacia la responsabilidad pero aún más hacia amor incomprensibles para la ciencia aún, la búsqueda de la felicidad que cuando te veo, llego a pensar que la felicidad acaso vive en ti. Junto con tu señora esposa, que ahora es parte de mi familia, Alicia que juntos me han dado una sorpresa de tener a una hija maravillosa que siempre anda con una inquietud, sencillez y valentía, no cabe duda que es su hija. Itzayana la niña más sonriente e inquita que hay en la familia temor de su prima Ximena que no puede comprender cómo una personita puede crear y destruir al mismo tiempo y hacerlo con gracia natural. A ustedes hermanos míos les agradezco porque este pequeño paso también es de ustedes.

A mis abuelos, personas de una gran sabiduría adquirida a través de los años. Tiempo que no perdona y que te quita vida mientras das la tuya por los que nacen, una nueva vida a la cual tú tendrás que guiar. Proceso que han hecho ustedes con más de cuatro generaciones de nietos. En nuestra cultura los abuelos son lo máspreciado que tenemos por su conocimiento, que en este caso no es la excepción, abuelos que la vida fue dura con ustedes y aun así encontraron la manera de cargar con ese peso, las historias que cuentan son hermosas pero es más hermoso ver cómo le sonrén a la vida aun lo que cuentan no son historia fáciles si no al contrario son muy difíciles, pero algo en sus ojos los hace ver como si le dijeran a la vida que ganaron. Gracias abuelo Francisco, abuela Fidelina, abuelo Lucas y en especial a mi abuela Josefina que hay más amor en sus regaños y mentadas de madre que en cualquier otra forma de amor.

A mis padres la piedra angular de mi educación y de mis valores morales, no tengo palabras para describir el sentimiento que me acompleja al momento de escribir esto, solo puedo decir que agradezco todo su esfuerzo por sacar adelante a mí y a mis hermanos, su incasable voluntad que incluso hacen ver fácil lo más difícil. Que aunque tenían problemas nunca se doblaron ante ellos pues eran conscientes que llevaban un gran peso sobre sus hombros. A mi madre Reynalda Juárez Vargas que cuyo amor es demasiado grande, dicen que no hay amor más puro que el amor de madre y creo que no se equivocan. Señora de carácter tranquilo, pero una persona con un gran sentido de comunidad y buscar un bien común que ha sabido transmitir a lo largo de los años a su descendencia. Hoy te doy gracias por cada abrazo, cada beso en la frente y cada regaño que me llevo de tu parte. ¿Cómo pagar todo eso? Incluso si te ofreciera toda la riqueza del mundo como forma de agradecimiento no alcanzaría para pagarlo que has hecho de mí, pues la riqueza material no es capaz de pagar algo tan valioso como tu amor que es lo más cercano de dios que tal vez llegue a conocer... es un amor trascendental. Solo queda decir gracias madre mía. Señor padre mío. Con el mismo nombre que su hijo es decir Pedro Romero Sebastián. ¿Qué puedo decir de tal personaje? Hombre de carácter fuerte, una visión del mundo sin igual, y aunque nunca lo he dicho amo las pláticas con un rico café con usted, pláticas que me hacen libre hablando de situaciones literarias y filosóficas que aunque tenemos libros y escritores favoritos diferentes y tal vez no coincidimos en el pensamiento de naturaleza filosófica por el momento podemos tener una relación padre hijo única. Valoro tu esfuerzo que hace día con día para sacar a tu familia adelante. Gracias padre por apoyar mis emprendimientos, mis ideas. Gracias infinitamente.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	III
DIFUSION DE RESULTADOS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. OBESIDAD	1
1.1. Definición y prevalencia de la obesidad	1
1.2. Relación de la obesidad con otras enfermedades.....	6
1.3. Regulación del peso corporal.....	8
2. BALANCE ENERGÉTICO.....	9
2.1. Regulación hipotalámica del balance energético	10
2.1.1. Regulación de la ingesta de alimento.....	11
2.1.2. Regulación del gasto energético	11
2.1.3. Rol del sistema de las melanocortinas en la regulación del balance energético ..	12
2.2. Inflamación hipotalámica y regulación del balance energético	14
3. FLAVONOIDES	17
3.1. Kaempferol	19
3.1.1. Kaempferol y su rol en la regulación del metabolismo energético	20
3.1.2. Propiedades antiinflamatorias del kaempferol	21
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	26
1. OBJETIVO GENERAL	26
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
2. ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS DE KAEMPFEROL CAPAZ DE MODULAR EL BALANCE ENERGÉTICO	28
3. INDUCCIÓN DE UN CUADRO DE OBESIDAD	29
4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE KAEMPFEROL SOBRE EL ESTADO DE OBESIDAD	30
4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KAEMPFEROL SOBRE LA INTOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA ..	31
4.1. Test de tolerancia a la glucosa.....	32
4.2. Test de sensibilidad a la insulina.....	32
5. EVALUACIÓN DE POTENCIALES CAMBIOS DEL ESTADO INFLAMATORIO HIPOTALÁLMICO INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KAEMPFEROL	33

5.1. Perfusión de los animales	33
5.2. Cortes histológicos.....	34
5.3. Marcación inmunohistoquímica de la microglía.....	34
5.4. Determinación del número y estado de activación de la microglía	35
6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO	36
6.1. Canulación.....	36
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
RESULTADOS	39
1. ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS DE KAEMPFEROL CAPAZ DE MODULAR EL BALANCE ENERGÉTICO	39
2. INDUCCIÓN DE LA OBESIDAD	40
3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES OBESOS.....	40
4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KF SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN RATONES OBESOS	42
5. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA CON KF SOBRE EL ESTADO INFLAMATORIO DEL HIPOTÁLAMO	43
6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE KF SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES OBESOS	44
DISCUSIÓN.....	45
CONCLUSIÓN.....	49
PERSPECTIVAS	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53
ANEXOS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

AgRP	Péptido relacionado con agouti
ARC	Núcleo arqueado del hipotálamo
CART	Transcripción regulada por cocaína y anfetamina
BE	Balance energético
CA	Consumo alimenticio
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
GE	Gasto energético
HFD	Dieta rica en grasa
KF	Kaempferol
IBA-1	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Masa Corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa
IR	Receptor de insulina
MCR	Receptor de melanocortina
NPY	Neuropéptido Y
OCDE	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Peso corporal
POMC	Proopiomelanocortina
PVH	Núcleo para-ventricular del hipotálamo
PYY	Péptido YY
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral α
α-MSH	Hormona estimulante de melanocitos

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1.** Imagen ilustrativa del estado de obesidad.
- Figura 2.** Predicción estadística sobre el aumento en la prevalencia de obesidad al 2030 (OCDE, 2018).
- Figura 3.** Prevalencia de obesidad en la población de varios países a nivel mundial(OCDE, 2018).
- Figura 4.** Prevalencia comparativa de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años en México en 2012 y 2016 (ENSANUT, 2016).
- Figura 5.** Prevalencia comparativa de sobrepeso y obesidad en adolescentes de 12 a 19 años en México en 2012 y 2016 (ENSANUT, 2016).
- Figura 6.** Prevalencia comparativa de sobrepeso y tipo de obesidad en adultos mayores de 20 años en México 2012-2016 (ENSANUT, 2016).
- Figura 7.** Prevalencia en adultos >20 años de sobre peso y tipo de obesidad en México por zona y tipo de localidad (ENSANUT, 2016).
- Figura 8.** Relación de la obesidad con otras enfermedades.
- Figura 9.** Regulación bidireccional del PC.
- Figura 10.** Representación del impacto del BE sobre el PC.
- Figura 11.** Regulación hipotalámica del BE.
- Figura 12.** Regulación del BE a través del efecto del sistema de las melanocortinas sobre el CA y el GE.
- Figura 13.** Activación de microglía por detección de ácidos grasos en el ARC.
- Figura 14.** Características morfofuncionales de la microglía dependiente de su estado de activación.
- Figura 15.** Estructura molecular general de los flavonoides.
- Figura 16.** Estructura molecular de los flavonoides con respectivos compuestos como ejemplos.
- Figura 17.** Síntesis y estructura molecular del kaempferol.
- Figura 18.** Efecto metabólico del kaempferol, indicando el mecanismo asociado con su función antidiabética, antiobesidad, protección cardiovascular y del daño oxidativo.
- Figura 19.** Mecanismos de la actividad antiinflamatoria del kaempferol.

- Figura 20.** Representación esquemática del diseño experimental para la determinación de la dosis de KF capaz de modular el balance energético.
- Figura 21.** Imagen ilustrativa de la diferencia fenotípica entre un ratón obeso y un ratón normo-peso.
- Figura 22.** Imagen ilustrativa de la técnica y la región anatómica para la inyección i.p.
- Figura 23.** Representación esquemática del diseño experimental para la determinación del efecto del tratamiento crónico con KF sobre el estado de obesidad.
- Figura 24.** Representación esquemática del diseño experimental para las pruebas TTG y TSI realizadas en ratones obesos tratados crónicamente con KF.
- Figura 25.** Imagen ilustrativa del proceso de perfusión.
- Figura 26.** Imagen ilustrativa del proceso de obtención de cortes en criostato del ARC.
- Figura 27.** Imagen ilustrativa del estado de reposo y de activación de la microglía basado en su morfología.
- Figura 28.** Imagen ilustrativa del área del ARC donde se determinó el nivel de activación de la microglía. Puntos irregulares en negro corresponden a microglías inmunomarcadas.
- Figura 29.** Imagen ilustrativa de la implantación de la cánula en el ventrículo lateral derecho.
- Figura 30.** Representación esquemática del diseño experimental para la determinación del efecto de la administración central de kaempferol sobre el balance energético.
- Figura 31.** Efecto del tratamiento agudo (24h, i.p.) con KF sobre el BE.
- Figura 32.** Inducción de un estado de obesidad en ratones.
- Figura 33.** Efecto del tratamiento crónico con KF sobre el BE en ratones obesos.
- Figura 34.** Efecto del tratamiento crónico con KF sobre la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina.
- Figura 35.** Efecto de la administración crónica con KF sobre el estado inflamatorio del hipotálamo.
- Figura 36.** Efecto agudo de la administración i.c.v. de KF sobre el BE en ratones obesos.

Figura 37. Modelo del mecanismo de acción del KF para inducir sus beneficios metabólicos.

Tabla 1. Composición de la DHL.

DIFUSION DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron presentados por el autor de la tesis en las manifestaciones científicas que se describen a continuación:

Presentaciones en congresos:

1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS PROMOVIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DEL FLAVONOIDE KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATÓN. **12° Congreso Estatal de Ciencias, Tecnología e Innovación y 6° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán**. 05 y 06 de octubre de 2017, Morelia, Michoacán. **Presentación en cartel** (constancia en anexo 1).
2. ESTUDIO DE LOS BENEFICIOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL FLAVONOIDE KAEMPFEROL EN RATONES OBESOS. **1^{er} Seminario Internacional de Desórdenes Metabólicos de la carrera en Industrias Alimentarias: Rol de la nutrición en el desarrollo y tratamiento de la obesidad y la diabetes**. 07 de septiembre de 2018, Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro, Tacámbaro, Michoacán. **Presentación oral**(constancia en anexo 2).
3. ESTABLECIENDO EL ROL DEL HIPOTÁLAMO EN LOS EFECTOS ANTIOBESIGÉNICOS DEL KAEMPFEROL. **14° Congreso Estatal de Ciencias, Tecnología e Innovación y 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán**. 29 y 30 de octubre de 2019, Morelia, Michoacán. **Presentación oral** (constancia en anexo 3).

Artículos:

1. Pedro A. Romero Juárez, Luis Miguel Saavedra Pimentel, Diego Bulcão Visco, Ana Elisa Toscano, Raul Manhães de Castro, Luz Torner & Omar Guzmán Quevedo. Estableciendo el rol del hipotálamo en los efectos antiobesigénicos del kaempferol. **Publicación in extenso** en el marco del 14° Congreso Estatal de Ciencias, Tecnología e Innovación y 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Morelia, Michoacán. 2019(constancia en anexo 4).
2. Romero-Juárez P, Urquiza-Martínez M, Visco D, Medina-Navarro R, Mercado-Camargo R, Toscano A, Manhães-de-Castro R, Torner L, Cota D & Guzmán-Quevedo O. Kaempferol induces metabolic benefits by regulating both energy balance and hypothalamic inflammation. **Artículo original en preparación** para someter a la revista *Journal of Neuroinflammation o Nutrients* (constancia en anexo 5).

INTRODUCCIÓN

1.OBESIDAD

1.1. Definición y prevalencia de la obesidad

La “Federación Mundial de Obesidad” define a la obesidad como una enfermedad con un proceso crónico, recurrente y progresivo(Bray, Kim, y Wilding 2017).De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud(**Figura 1**) (OMS, 2015). La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial, fruto de la interacción entre genotipo y ambiente(Galicia-Negrete y Falfán-Valencia 2017)



Figura 1. Imagen ilustrativa del estado de obesidad. Se muestra una acumulación de tejido graso en la parte abdominal aumentando la circunferencia de cintura (imagen extraída de Google).

El grado de obesidades determinado por el índice de masa corporal (IMC), una relación entre peso corporal (PC) y altura dada por la fórmula matemática $IMC=PC/altura^2$. Un $IMC \geq 25$ refiere un sobrepeso, ≥ 30 obesidad e ≥ 40 es considerada obesidad mórbida(Baltasar 2001). Aunque en los últimos años se ha observado que este IMC no distingue entre el contenido de masa grasa ni masa magra por lo que se han incorporado nuevos índices de medición como la circunferencia abdominal y otras medidas antropométricas para mostrar la acumulación de grasa. Los valores de referencia en hombres y mujeres de >94 y >80 cm, respectivamente, (**Figura 1**). (Keihani et al. 2015).

Esta enfermedad ha ido evolucionado a lo largo del tiempo pasando de un problema poco común a ser considerada en nuestros tiempos la pandemia del siglo XXI. Por lo general se asoció a estratos sociales altos, lo cual contrasta con las décadas recientes en las cuales se ha mostrado un aumento en su prevalencia abarcando desde estrato social más alto hasta al más bajo(Ando et al. 2008). La OMS presenta datos alarmantes sobre prevalencia mundial de obesidad; en 2016 más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales más de 650 millones eran obesos. Esto representa un 39% de la población mundial con sobrepeso y un 15% con un grado de obesidad (11% en hombres y 15% en mujeres). Según estimaciones, 41 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso u obesidad, de igual manera, este mismo año había 340 millones de niños y adolescentes entre los cinco y diecinueve años con sobrepeso u obesidad (OCDE 2018). Para el 2020 se prevé que seis de los países con mayor prevalencia de obesidad en el mundo serán latinoamericanos(Cirilo 2012). México tiene el segundo lugar a nivel mundial en sobre peso y obesidad solo por detrás de E.E.U.U. y por encima de Nueva Zelanda como se observa en la **Figura 3**(OCDE,2018). De igual forma para el año 2030 se espera un aumento en EE. UU, México e Inglaterra de un 49%, 37% y 35% respectivamente en la población con obesidad como lo muestra la **Figura 2**(OCDE, 2018).

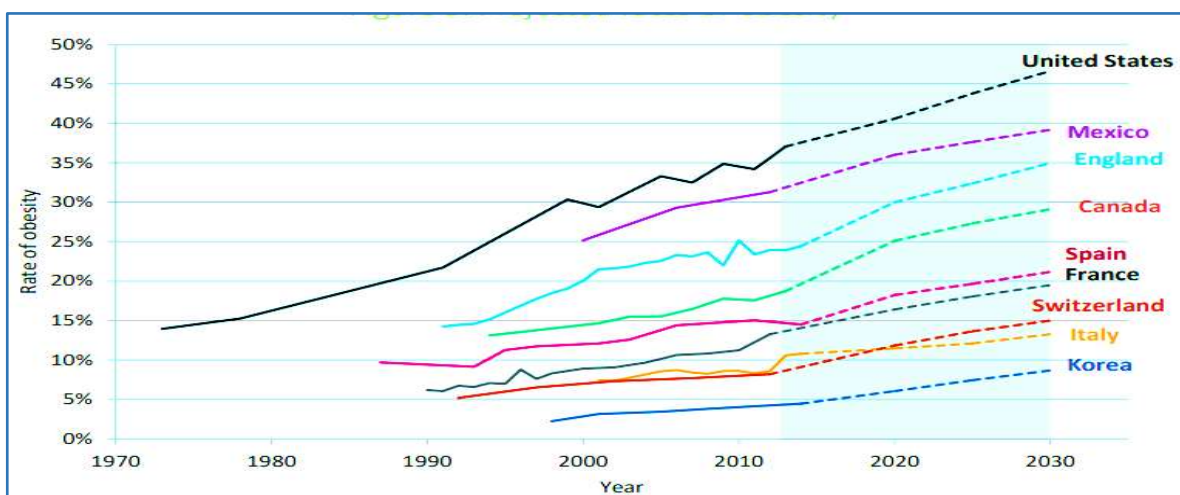


Figura 2. Predicción estadística sobre el aumento en la prevalencia de obesidad al 2030. Representación estadística del incremento de obesidad en los últimos 40 años, así como unapredicción de los futuros 20 años (hasta el 2030) donde México y E.E.U.U. ocupan los primeros lugares de la gráfica (OCDE, 2018).

En México el sobrepeso (obesidad incluida) representa actualmente un problema mayor de salud pública, ya que afecta a una gran parte de la población correlacionándose positivamente con la edad y de manera indistinta considerando el sexo y las regiones.

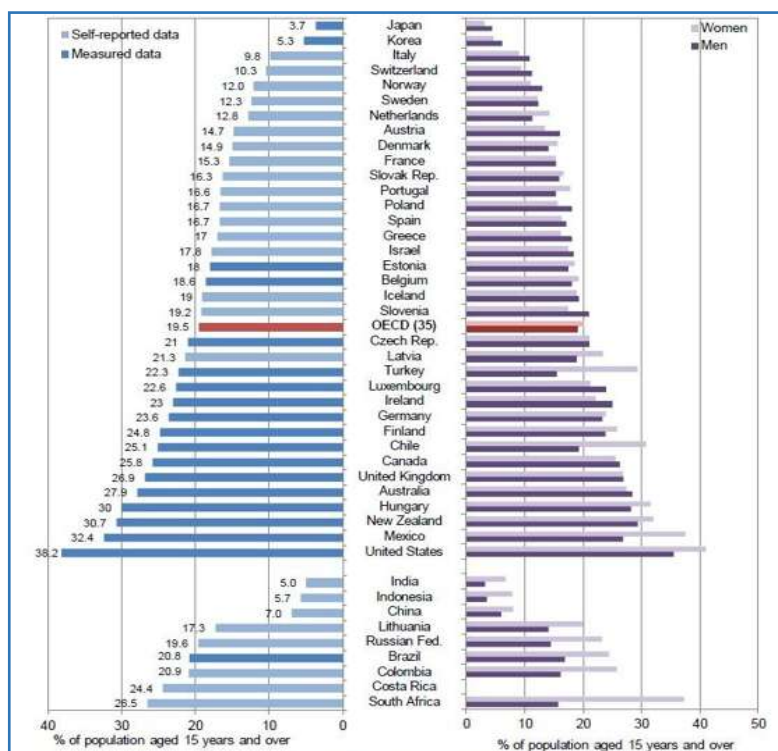
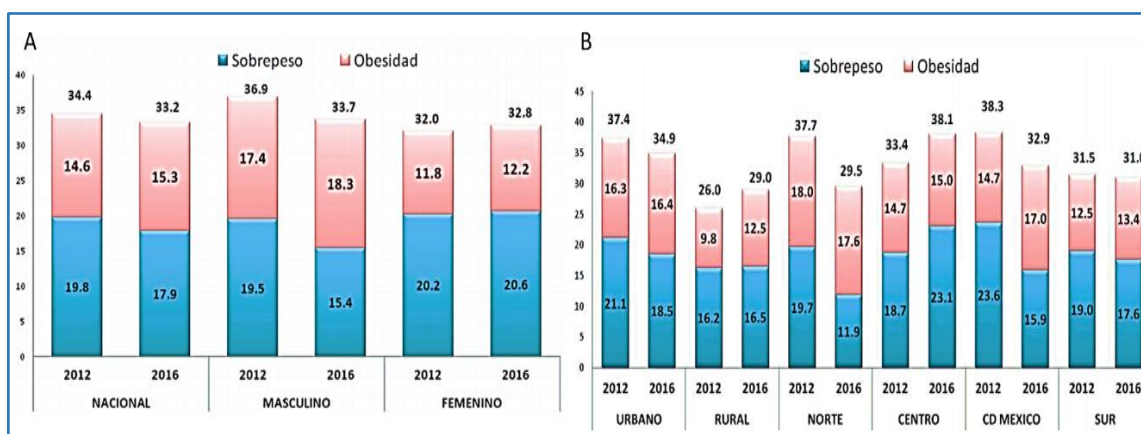


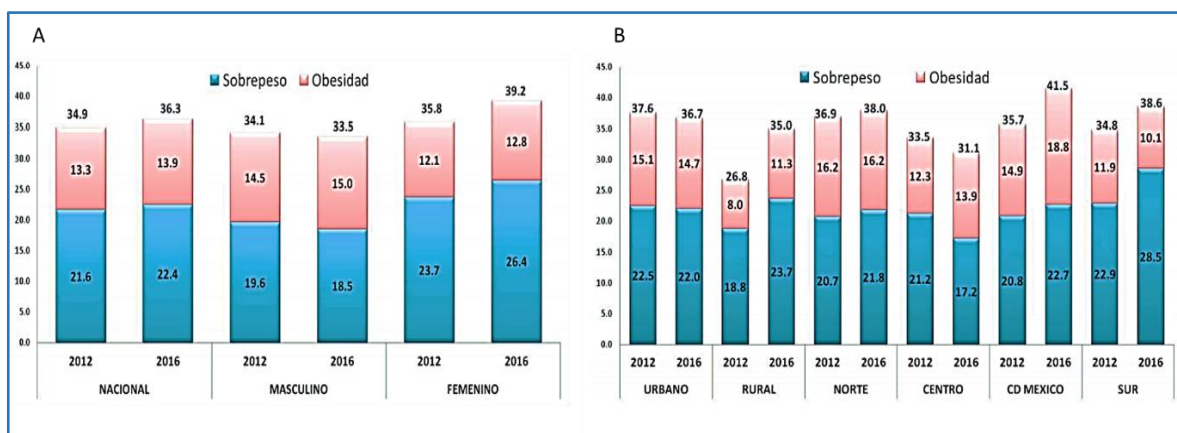
Figura 3. Prevalencia de obesidad en la población de varios países a nivel mundial. México tiene el segundo lugar a nivel mundial en sobre peso y obesidad solo por detrás de E.E.U.U. y por encima de Nueva Zelanda (Estadísticas de salud, OCDE, 2018).

En efecto, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) muestra que en 2016 el 33.2% de los infantes (entre 5 y 11 años) (**Figura 4**) y el 36% de adolescentes (entre 12 y 19 años) (**Figura 5**) presentan sobrepeso u obesidad (ENSANUT, 2016). En adolescentes se observó un aumento en la prevalencia de obesidad en comunidades rurales y la Cd. de México (**Figura 5**).



Figuras4. Prevalencia comparativa de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años en México en 2012 y 2016.(A) datos nacionales: masculino y femenino, (B) por zona y tipo de localidad. En localidades urbanas se mostró un (34.9%) de prevalencia en comparación con las localidades rurales (29.0%)(ENSANUT, 2016).

En adultos, la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad fue de 71.2% en el 2012 y de 72.5% en el 2016, mostrando un incremento (ENSANUT, 2012/2016). Asimismo, la categoría de obesidad mórbida es 2.4 veces más alta en mujeres que en hombres como se observa en la **Figura 6**. Por tipo de localidad, la prevalencia de sobrepeso fue 11.6% más alta en las localidades rurales que en las urbanas y la prevalencia de obesidad fue 16.8% más alta en las localidades urbanas que en las rurales, como lo muestra la **Figura 7** (ENSANUT 2016).



Figuras 5. Prevalencia comparativa de sobrepeso y obesidad en adolescentes de 12 a 19 años en México en 2012 y 2016. (A) datos nacionales: masculino y femenino, (B) por zona y tipo de localidad. La prevalencia en hombres fue de 33.5% y en mujeres de 39.2%. Así mismo, la prevalencia en localidades urbanas disminuyó de 37.6% en 2012 a 36.7% en 2016, mientras en localidades rurales se observa un aumento de 8.2 puntos porcentuales. (ENSANUT, 2016).

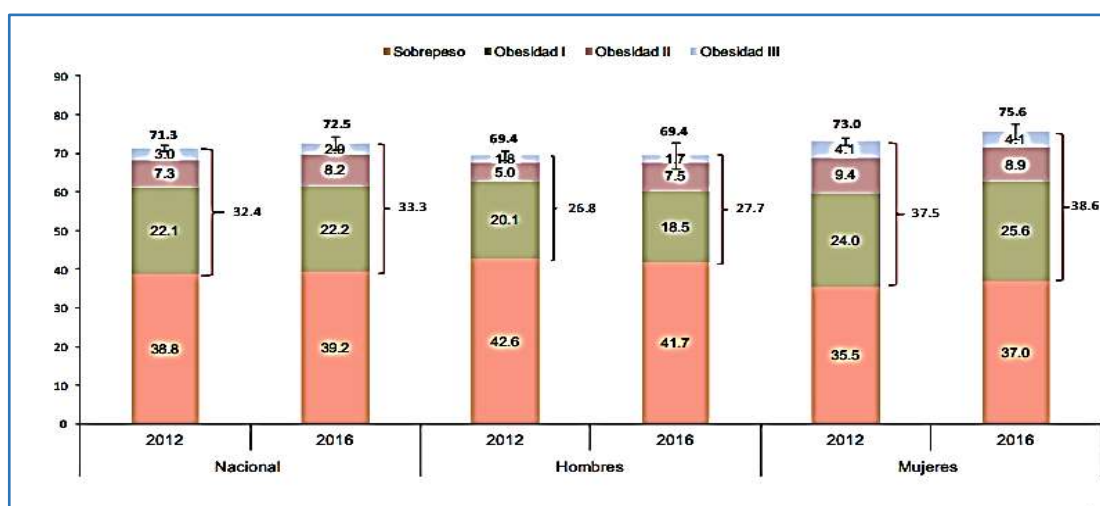


Figura 6. Prevalencia comparativa de sobrepeso y tipo de obesidad en adultos mayores de 20 años en México 2012-2016. Al categorizar por sexo en 2016 se observa que la prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad es mayor en las mujeres (75.6%) que en los hombres (69.4%); y que la prevalencia de obesidad es también más alta en el sexo femenino (38.6%) que en el masculino (27.7%). Asimismo, la categoría de obesidad mórbida es 2.4 veces más alta en mujeres que en hombres (ENSANUT, 2016).

Se propone que además de factores como el sedentarismo y el consumo elevado de dietas hipercalóricas asociado a los procesos de alta urbanización que se vive en la actualidad, el bajo consumo de alimentos de origen vegetal influye de manera determinante en el desarrollo de obesidad. Apoyando esta hipótesis observaciones hechas por nuestro equipo de trabajo mostraron en ratas que si el consumo de dieta hipercalóricas es asociado al consumo de harina de nopal, dichos animales no desarrollan un cuadro de obesidad y alteraciones asociadas (Cysneiros Grazielle Fonseca 2019). Nuestro equipo de investigación ha igualmente mostrado que el consumo de harina de nopal adicionada a una dieta hiperlipídica revierte la adiposidad y alteración del metabolismo de la glucosa en ratones (Artículo en revisión en la revista "*British Journal of Nutrition*"). Los hallazgos mencionados indican que contribuye más la falta de vegetales en la alimentación que la condición hipercalórica de la misma, sugiriendo que compuestos con capacidad bioactiva presentes en el nopal serían los potenciales responsables del beneficio metabólico de su consumo.

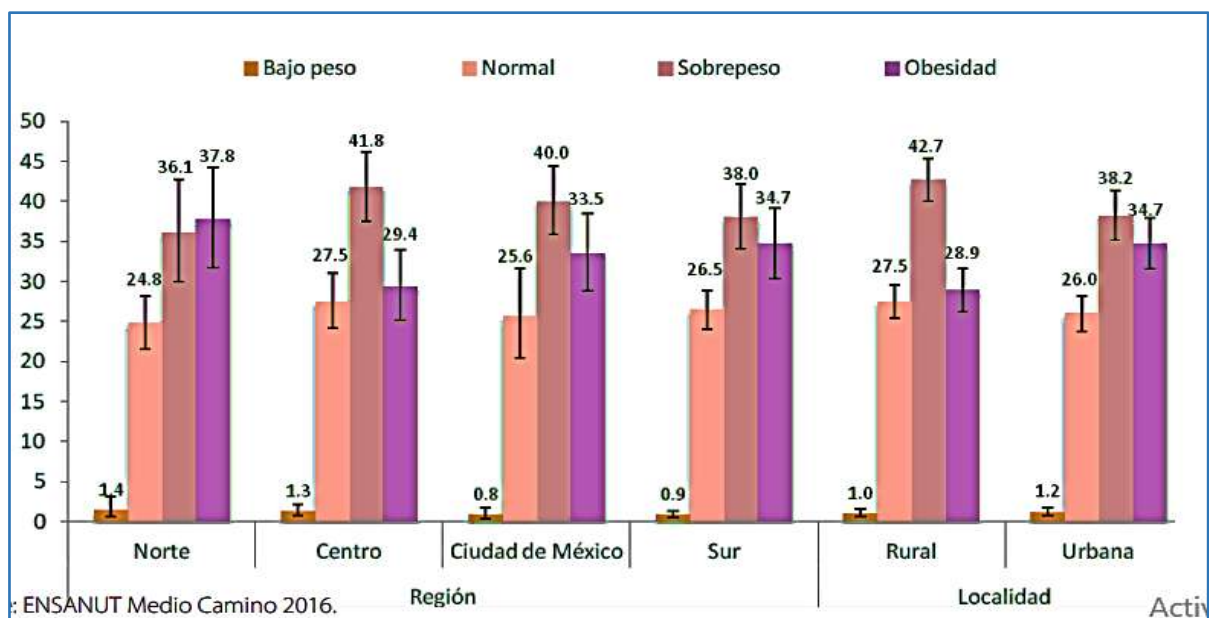


Figura 7. Prevalencia en adultos >20 años de sobre peso y tipo de obesidad en México por zona y tipo de localidad., la prevalencia de sobrepeso fue 11.6% más alta en las localidades rurales que en las urbanas y la prevalencia de obesidad fue 16.8% más alta en las localidades urbanas que en las rurales. En la categorización por regiones, la prevalencia de obesidad fue mayor en la Región Norte que en el Centro (-22.2%), Ciudad de México (-11.4%) y región Sur (-8.2%)(ENSANUT, 2016).

1.2. Relación de la obesidad con otras enfermedades

La obesidad es una enfermedad que es de suma importancia en salud pública por su alto costo humano y económico. Su relevancia recae en el hecho de ser el principal factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades como la hipertensión, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares y, sobre todo, diabetes de tipo 2 (DT2). Además, está asociada con otros padecimientos como la infertilidad, apnea del sueño, depresión, etc. (**Figura 8**). La masa grasa generada en la obesidad produce cambios estructurales y hemodinámicos en el sistema cardiaco lo que lleva a una insuficiencia cardiaca (IC). Aunque la obesidad aumenta el riesgo de afecciones cardiacas parece tener un efecto protector en pacientes diagnosticados con una IC antes de generar un cuadro obesigénico que lleva a la paradoja de la obesidad. Sin embargo, estos efectos directos de la obesidad sobre el sistema cardiovascular requieren una mayor exploración (Carbone, Lavie, y Arena 2017; Kawarazaki y Fujita 2016). La obesidad se relaciona con afecciones respiratorias y gástricas que son de origen mecánico por la disminución en la capacidad residual funcional y del volumen corriente, estos cambios reducen el estiramiento de los músculos lisos (Galicia-Negrete y Falfán-Valencia 2017). También aumenta el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (mama, colon, hígado, entre otros) y se asocia con un peor resultado clínico. El mecanismo por el cual la obesidad promueve y se desarrolla el cáncer es altamente complejo y específico para cada tejido así como el tipo de cáncer (Kolb, Sutterwala, y Zhang 2016). Algunos procesos inflamatorios sistémicos y centrales están relacionados estrechamente con un trastorno de depresión mayor (TDN); si bien es un proceso complejo y multifactorial, desde el punto de vista epidemiológico parece que esta inflamación contribuye tanto a la obesidad como a la depresión y otros problemas de conducta (Ambrósio et al. 2018).

Varios organismos de índole internacional colocan dentro de la definición de un síndrome metabólico como punto central de su afección, la acumulación excesiva de grasa. Hablando en términos claros colocan a la obesidad como epicentro de dicho síndrome. Como se menciona precedentemente, esta enfermedad está estrechamente relacionada con la DT2. Esta última es una enfermedad que se manifiesta como un aumento excesivo de glucosa en sangre en condiciones de ayuno, arriba de 100 mg/dL (Federación Internacional de la Diabetes, 2018). El exceso se debe a la incapacidad de los tejidos (músculo, hígado, tejido adiposo) para capturar la glucosa de la sangre debido a una resistencia a la insulina o a una baja producción de esta hormona (Steppan et al. 2001). En estudios epidemiológicos se mostró que pacientes con una acumulación de grasa abdominal tenían una prevalencia mayor a sufrir diabetes (Hartz 1983). El mecanismo subyacente de esta relación obesidad-diabetes no es claro pero se proponen varios mecanismos, entre ellos se propone que puede estar relacionado con la secreción de una hormona por parte de los adipocitos llamada resistina. Se ha demostrado que incrementando la presencia de esta molécula la pruebas de resistencia a la insulina y tolerancia a la glucosa empeora en ratones obesos (Steppan et al. 2001). Otros mecanismos

podrían estar involucrados en la correlación entre el estrés del retículo endoplasmático (ERE) con la obesidad y su relación con diabetes (Cnop, Foufelle, y Velloso 2012). Se ha señalado que ERE en el hipotálamo podría estar estrechamente ligada con la resistencia a la insulina y a la leptina (Dandona 2004). Por otro lado el estrés en células pancreáticas genera hígado graso así como resistencia a la insulina. El estado prolongado de estrés en el retículo endoplasmático puede llevar a una apoptosis de las células β -pancreáticas (Cnop et al. 2012). Teniendo en cuenta lo anterior, algunos estudios sugieren a la obesidad como un estado proinflamatorio aunado a un estrés oxidativo esto por una sobrenutrición, lleva a una alza en la concentración de citocinas, que podría interferir con la transducción de la señal de la insulina (Jais y Brüning 2017a). También en pacientes obesos se ha observado que presentan elevación de citocinas proinflamatorias y una disminución de factores antiinflamatorios que conllevan a cambios en la salud del paciente como son la resistencia a la insulina y un aumento en la glucosa sérica (Dandona 2004). Interesantemente, varios estudios llevados a cabo en ratones han demostrado una relación directa entre el estado inflamatorio hipotalámico y la resistencia a la insulina (Jais y Brüning 2017a).



Figura 8. Relación de la obesidad con otras enfermedades. Muestra a la obesidad como epicentro de una serie de problemas de salud estrechamente relacionada con dicha afección, algunas de ellas siendo unas de las principales de muerte a nivel mundial (imagen extraída de Google).

1.3.Regulación del peso corporal

El peso corporal (PC) no es estacionario ni cambia de manera unidireccional (**Figura 9**). Por el contrario, los factores que alejan el PC del punto de ajuste se definen como no homeostáticos y se rigen por múltiples mecanismos. Hay factores que restablecen el PC del punto de ajuste que se definen como homeostáticos y operan a través de mecanismos que regulan el balance energético (BE) (equilibrio entre calorías consumidas y calorías gastadas) a corto plazo impulsado por el hambre y la saciedad y el BE a largo plazo impulsado por cambios en la adiposidad (Yu 2017). Los cambios de PC están acompañados por desequilibrios entre la ingesta de calorías y el gasto energético (GE), este hecho a menudo se malinterpreta para sugerir que cambio de peso positivamente es causado por la gula y la pereza. Por esta mala interpretación mucha gente considera que se puede tratar simplemente recomendando a los pacientes que coman menos y tenga mayor actividad física sin pensar los componentes del BE que están relacionados dinámicamente con los procesos fisiológicos (Hall y Guo 2017).



Figura 9. Regulación bidireccional del PC. El índice de masa corporal indica el incremento de la ganancia de peso desde un estado de desnutrición hasta la obesidad (Imagen extraída de Google).

2.BALANCE ENERGÉTICO

La regulación del metabolismo es un resultado de la complejidad del BE, entre el consumo alimenticio (CA) y gasto energético (GE), los cuales son dependientes de la ingesta de alimentos que está dada por el apetito, dicho balance se encuentra regulado en el sistema nervioso central(Farias et al., 2017).El BE no es una simple suma algebraica de GE e ingesta de energía como se muestra a menudo. El BE es un proceso dinámico y existen efectos recíprocos entre el CA y el GE (**Figura 10**). Una distinción importante es la de los componentes metabólicos y de comportamiento del GE(Hopkins y Blundell 2016).

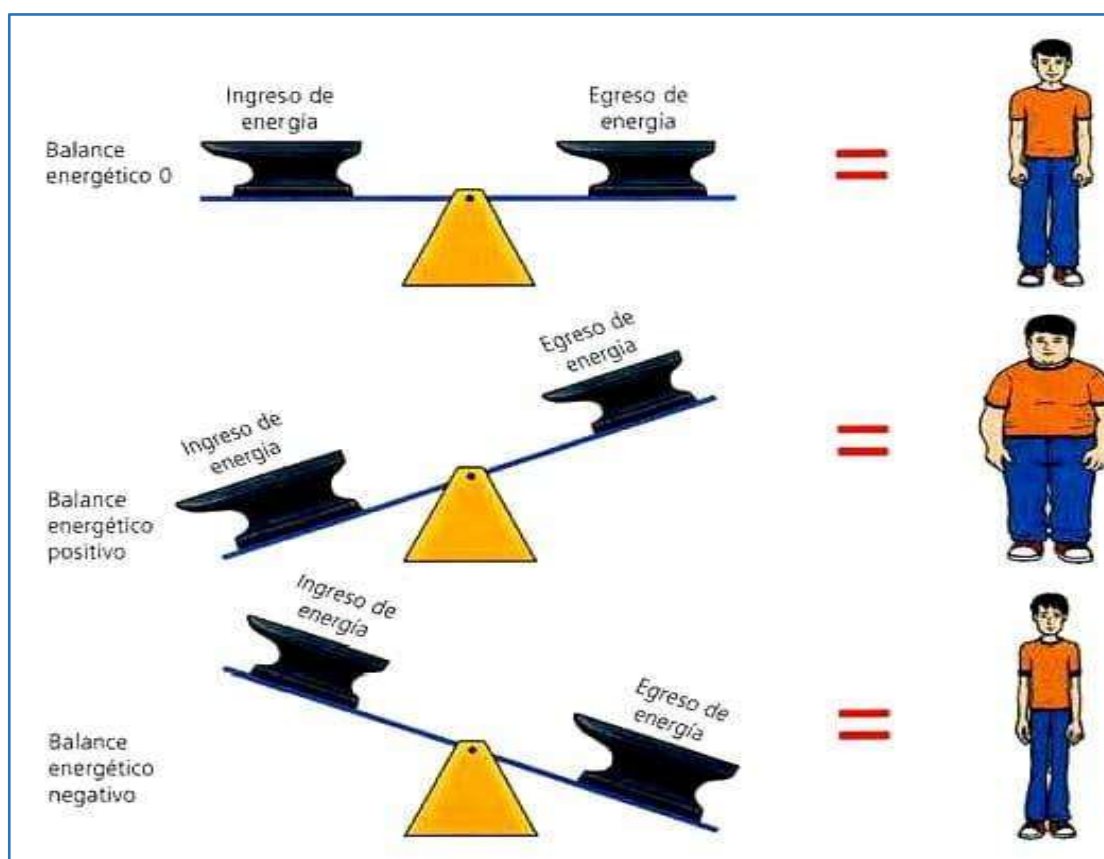


Figura 10. Representación del impacto del BE sobre el PC. Un equilibrio entre el gasto energético y el consumo de alimento da un resultado un IMC normal como lo muestra en la parte superior, sin embargo un desbalance positivo entre estos dos factores, es decir el consumo alimenticio es mayor al gasto energético resulta en un problema de sobrepeso como se muestra en la imagen del medio, por otra parte existe su contraparte; un déficit de energía como lo muestra la ilustración de la parte inferior, (imagen extraída de Google).

2.1.Regulación hipotalámica del balance energético

La regulación del BE se lleva a cabo en el cerebro. Diferentes circuitos neuronales trabajan de manera sincronizada para mantener la homeostasis energética. Estos circuitos tienen su punto de convergencia en el hipotálamo (**Figura 11**), donde integran estímulos externos e internos para inducir respuestas metabólicas (Schaeffer, Hodson, y Mollard 2014). El hipotálamo ha recibido una atención significativa dada su capacidad para influir en el comportamiento alimenticio y el GE, a través de la integración de señales nutricionales vehiculadas por hormonas (leptina, insulina, grelina, etc.) (**Figura 11**). El núcleo arqueado (ARC) en el hipotálamo juega un rol central en dichos procesos, ya que en esta estructura la barrera hematoencefálica es más permisiva para el transporte de compuestos de la sangre. Además, en este núcleo las neuronas de primer orden que detectan las señales hormonales extienden sus prolongaciones axonales a otros núcleos del hipotálamo (área hipotalámica lateral –LHA–, núcleo ventromedial –VMN– y núcleo paraventricular –PVN– donde activa neuronas de segundo orden, induciendo efectos anorexigénicos (inhibición del apetito) u orexigénicos (inducción del apetito) (**Figura 11**) (Waterson y Horvath 2015).

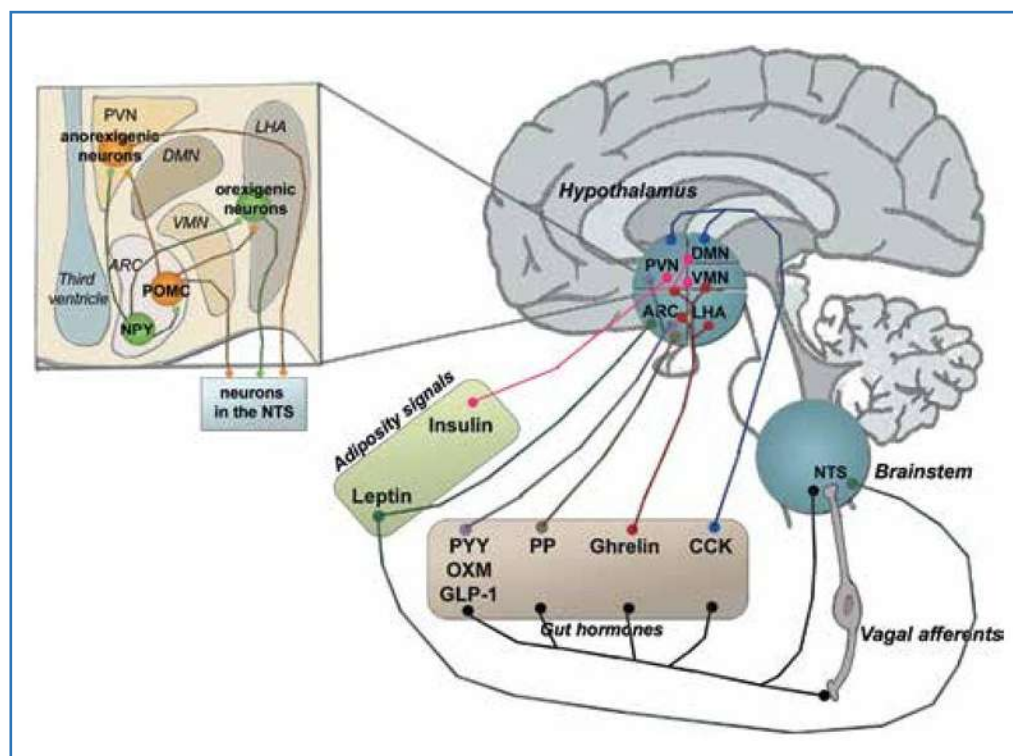


Figura 11. Regulación hipotalámica del BE. La información que refleja el estado nutricional del organismo es comunicada por hormona como la leptina, insulina y grelina, quienes actúan directamente en el hipotálamo o a través de su acción sobre el nervio vago o núcleo del tracto solitario (NTS), induciendo respuestas anorexigénicas (PVN) u orexigénicas (LHA) (extraído de Schaeffer et al. 2014).

2.1.1. Regulación de la ingesta de alimento

La decisión de comer o no comer implica la interacción del hipotálamo y tejidos periféricos. Luego de la detección en el ARC de las señales nutricionales provenientes del tejido adiposo (léptina), el páncreas (insulina) y tracto digestivo (grelina, péptido similar al glucágon-1 –GLP-1–, péptido YY –PYY–, etc.) se establece el estado energético del organismo generando respuestas que promueven un CA (si hay un déficit de energía) o a la inhibición del mismo (si hay exceso de energía) (**Figura 12**)(Farias et al., 2017).

Existe una creciente evidencia que demuestra que un aumento en las actividades simpáticas y termogénicas está asociado con la reducción de la ingesta de alimentos. Por lo tanto, es razonable suponer que la obesidad también puede ser causada por un aumento en el CA resultante de la reducción de la actividad simpática. Hay una llamada cascada de saciedad la cual se desarrolla desde tres ejes involucrando patrones psicológicos y de comportamiento, eventos metabólicos, fisiológicos periféricos, interacciones neurales y metabólicas en el cerebro. La información sensorial derivada de la fase cefálica de la digestión y la señalización vagal aferente provocada por la presencia de alimentos en el estómago proporciona información temprana al cerebro sobre la cantidad y el contenido de nutrientes de los alimentos consumidos(Harpaz et al. 2016; Hopkins y Blundell 2016).

2.1.2. Regulación del gasto energético

Los principales determinantes del GE son el tamaño y composición corporal, la ingesta de alimentos, el entorno y la actividad física; así, un cuerpo de mayor tamaño requiere más energía para su mantenimiento. El GE, se puede dividir en: GE en reposo, inducido por el ARC en el hipotálamo (termogénesis) (**Figura 12**), GE inducido por la dieta, GE inducido por la actividad física, todo en relación con las características morfológicas del sujeto, así como su actividad física y su ingesta de alimento (Westerterp 2017). Dicho mecanismo predispuso un gran avance evolutivo, lo cual permitió la conquista de todo el mundo por parte de los mamíferos (Cerri 2017).

El GE es un mecanismo altamente complejo; en estudios realizados en ratones obesos modificados genéticamente, demostraron que la termogénesis desempeña un papel fundamental en la homeostasis energética (Kazak et al. 2017). Este GE está regulado de manera hormonal y uno de los mecanismos sugeridos es la participación de la tiroides, en específico la hormona tiroidea que aumenta la termogénesis en su forma activa (T3), se han propuesto mecanismo para cada órgano, pero aún su etiología no está bien establecida (Fontenelle et al. 2016). Se ha sugerido que un reducido GE, en cualquiera de sus modalidades o combinadas, desempeña un papel en el desarrollo de la obesidad(Carneiro et al. 2016).

2.1.3. Rol del sistema de las melanocortinas en la regulación del balance energético

El control del BE es altamente complejo, involucra una red neuronal regulada notablemente dentro del hipotálamo. Ciertamente, en el ARC existen dos poblaciones neuronales con funciones antagónicas, que constituyen el sistema de las melanocortinas (Derghal et al. 2017). Una población está conformada por las neuronas que expresan los neuropéptidos de proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), las cuales reducen el CA y aumentan el GE, la segunda población está constituida por neuronas que expresan los neuropéptidos denominados, péptido relacionado con agouti (AgRP) y neuropéptido Y (NPY) cuya actividad induce el CA y reducen el GE (Wilson y Enriori 2015) (**Figura 12**). Cabe resaltar que el NPY regula la ingesta de alimento a corto plazo inhibiendo las neuronas POMC/CART y neuronas de segundo orden mientras que el AgRP inhibe el CA a largo plazo a través de efectos sobre neuronas de segundo orden (**Figura 12**) (Wilkinson y Imran 2018). Los sitios secundarios de acción del sistema de las melanocortinas son los receptores de melanocortina (MCR) presentes en las neuronas de segundo orden. Entre los más importantes, está el receptor de melanocortina 3 (MC3R) y el receptor de melanocortina 4 (MC4R), que se encuentran preferencialmente en las neuronas del PVN. La hormona estimulante de melanocitos (α -MSH), derivado de POMC, es un potente ligando endógeno para MC3R y MC4R, involucrados en la regulación del PC y el aumento en el GE, en contraparte AgRP sirve como el principal péptido endógeno que antagoniza directamente la acción de la α -MSH compitiendo por la unión a los MCR e inhibiendo la activación del receptor (**Figura 12**) (De Jonghe, Hayes, y Bence 2011).

El sistema de las melanocortinas recibe señales hormonales y nutricionales que se secretan de la periferia en tejidos como: estómago (greлина), páncreas (insulina) y tejido adiposo blanco (leptina) (**Figura 12**). Es conocido que estas hormonas y sus fluctuaciones en los niveles de concentración actúan de forma catabólica en caso de la leptina y la insulina, y anabólica en caso de la greлина. Además, este balance depende de los niveles circulantes de glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y hormonas gastrointestinales que reflejan el estado nutricional del organismo (Caron y Richard 2017). La leptina regula tanto las neuronas POMC/CART como NPY/AgRP a diferentes niveles, esta hormona aumenta los niveles ARNm de POMC y disminuye ARNm de NPY/AgRP así como despolariza (activa) las neuronas POMC, simultáneamente hiperpolariza (desactiva) neuronas NPY/AgRP (**Figura 12**). Los receptores de insulina (IR) se expresan ampliamente en el cerebro (**Figura 12**), las evidencias son controversiales ya que en ratones con deficiencia de este receptor en el cerebro desarrollan obesidad, sin embargo la eliminación de este receptor en el sistema de las melanocortinas, no mostró alteración, lo cual nos sugiere la activación de diferentes subpoblaciones POMC en la homeostasis energética (Derghal et al. 2017). La greлина, conocida como la hormona del hambre, se sintetiza como una preprohormona y se requieren varios procesos para su forma activa, la cual ejerce su efecto a través de la unión al receptor del secretagogo de la hormona de

crecimiento (GHSR) que se expresa altamente en neuronas NPY/AgRP (**Figura 12**), además la grelina eleva la concentración ARNm de NPY/AgRP así como una mayor actividad eléctrica, también regula positivamente la prolilcarboxipeptidasa, enzima que degrada la α -MSH (Kim, Leyva, y Diano 2014).

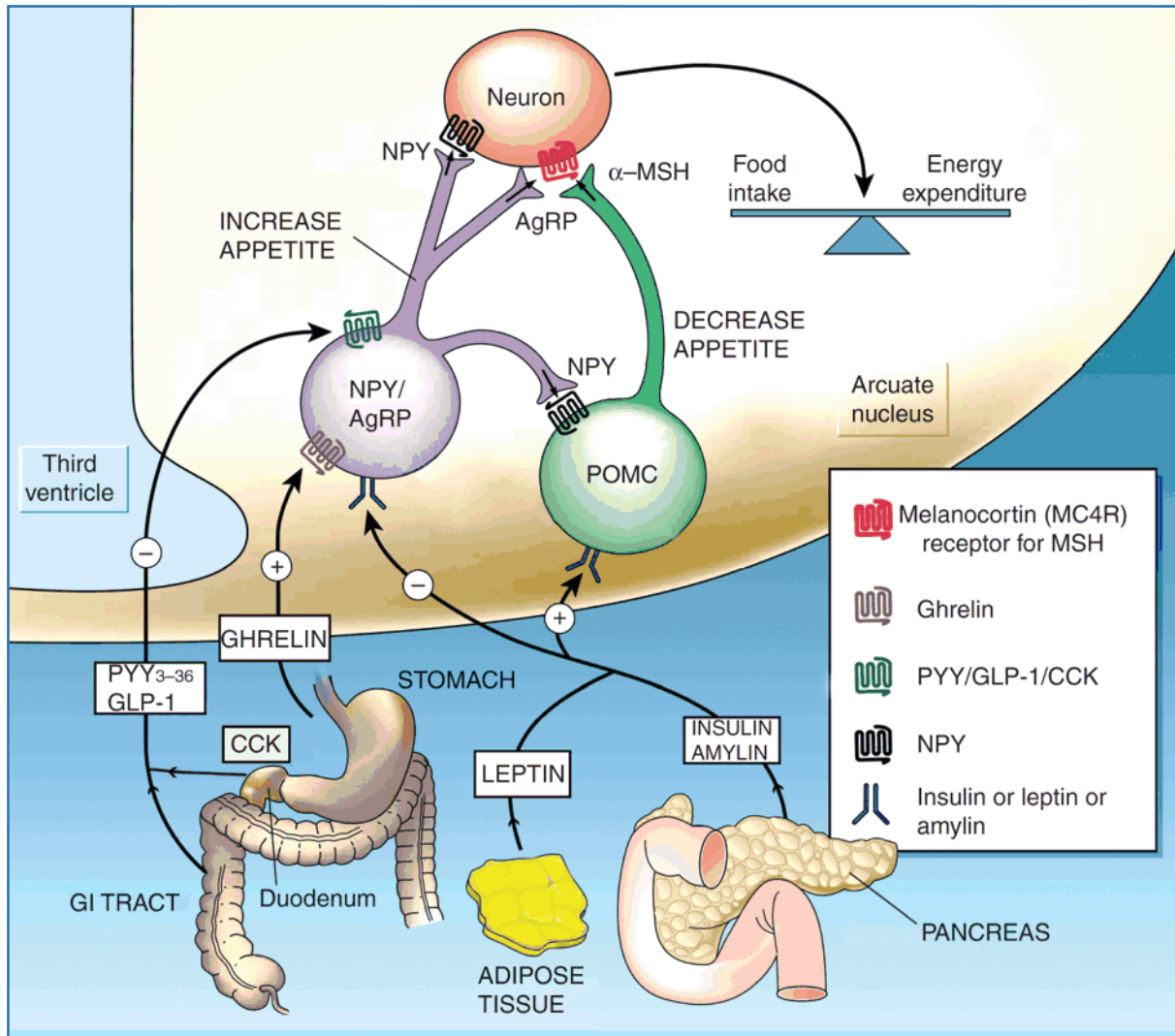


Figura 12. Regulación del BE a través del efecto del sistema de las melanocortinas sobre el CA y el GE. Señales hormonales secretadas por diferentes órganos, como lo son insulina (páncreas), gréлина (estómago), léptina (tejido adiposo) son transportados desde la periferia hacia ARC del hipotálamo donde regulan la activación de dos poblaciones neuronales de primer orden que consisten de neuronas POMC/CART (incrementa el GE y disminuyen CA) y sus antagónicas, neuronas NPY/AgRP (disminuyen el GE e incrementa CA) (extraído de (Wilkinson y Imran 2018))

2.2. Inflamación hipotalámica y regulación del balance energético

En los últimos años se ha hecho evidente el rol del cerebro en el desarrollo de la obesidad, la mayor parte de la evidencia apunta al desacoplamiento de la regulación del BE debido al desarrollo de un cuadro de inflamación en el hipotálamo inducido por el consumo de dietas hiperlipídicas (HFD)(Dorfman y Thaler 2015). Diversos estudios han demostrado que la dieta rica en grasa, en particular los ácidos grasos saturados de cadena larga (SFA), inducen dicha inflamación(De Souza et al. 2005), además son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en el ARC donde reducen la señalización anorexigénica de la insulina y la leptina(Dalvi et al. 2017). Por el contrario las grasas insaturadas disminuyen la inflamación hipotalámica(Dragano et al. 2017).

En modelos animales se ha mostrado que la alimentación con una dieta HFD lleva a altos niveles de mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucina 1β (IL- 1β) e interleucina 6 (IL-6) en el hipotálamo, particularmente en el ARC (Dorfman y Thaler 2015). Además, estas citosinas llevan a la activación de enzimas como c-Jun N-terminal (JNK) e I κ B quinasa (IKK), se producen rápidamente una vez iniciado el consumo de HFD, incluso antes del aumento significativo de PC y disminuyen la sensibilidad a la insulina(Thaler et al. 2012). También se han propuesto varios mecanismos por el cual las grasas saturadas actúan en el sistema nervioso central (SNC), como la activación del receptor tipo toll (TLR) en específico TLR4 y la inducción del ERE. Se sugiere que la activación de TLR4 en la microglía, la célula inmunitaria del cerebro, es predominante en la liberación de citocinas proinflamatorias e inducción del estrés oxidativo por estas células nerviosas (Lee et al. 2015), sugiriendo que el ERE es un evento posterior en la cascada que finalmente conduce a la activación inflamatoria del hipotálamo (De Souza et al. 2005; Dragano et al. 2017; Ozcan et al. 2009). Se ha demostrado, por nuestro equipo de trabajo y otros, que la proliferación y activación de la microglía es esencial para el desarrollo de la obesidad (**Figura 13**) (Valdearcos., et al 2011; André et al., 2017). En efecto, se ha observado un incremento de la proliferación celular microglial en el ARC en ratones alimentados con HFD asociada a un incremento más rápido en su masa grasa y PC en comparación con ratones alimentados con una dieta estándar(André et al. 2017).

Recientemente se realizan investigaciones para ver la participación de astrocitos y microglías en el BE y la inflamación hipotalámica. Se ha observado que tanto en cultivos celulares como en ratones *in vivo* los astrocitos hipotalámicos acumulan gotas de lípidos en condiciones enriquecidas con ácidos grasos saturados, como la obesidad. Así mismo, elevan sus marcadores de astrogliosis y citocinas inflamatorias (TNF α , IL- 1β , IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos 1 –MCP-1–). Además estos astrocitos cargados de lípidos estimulan la actividad quimiotáctica de la microglía IBA-1 y citocinas (Douglass, Dorfman, y Thaler 2017; Kwon et al. 2017).

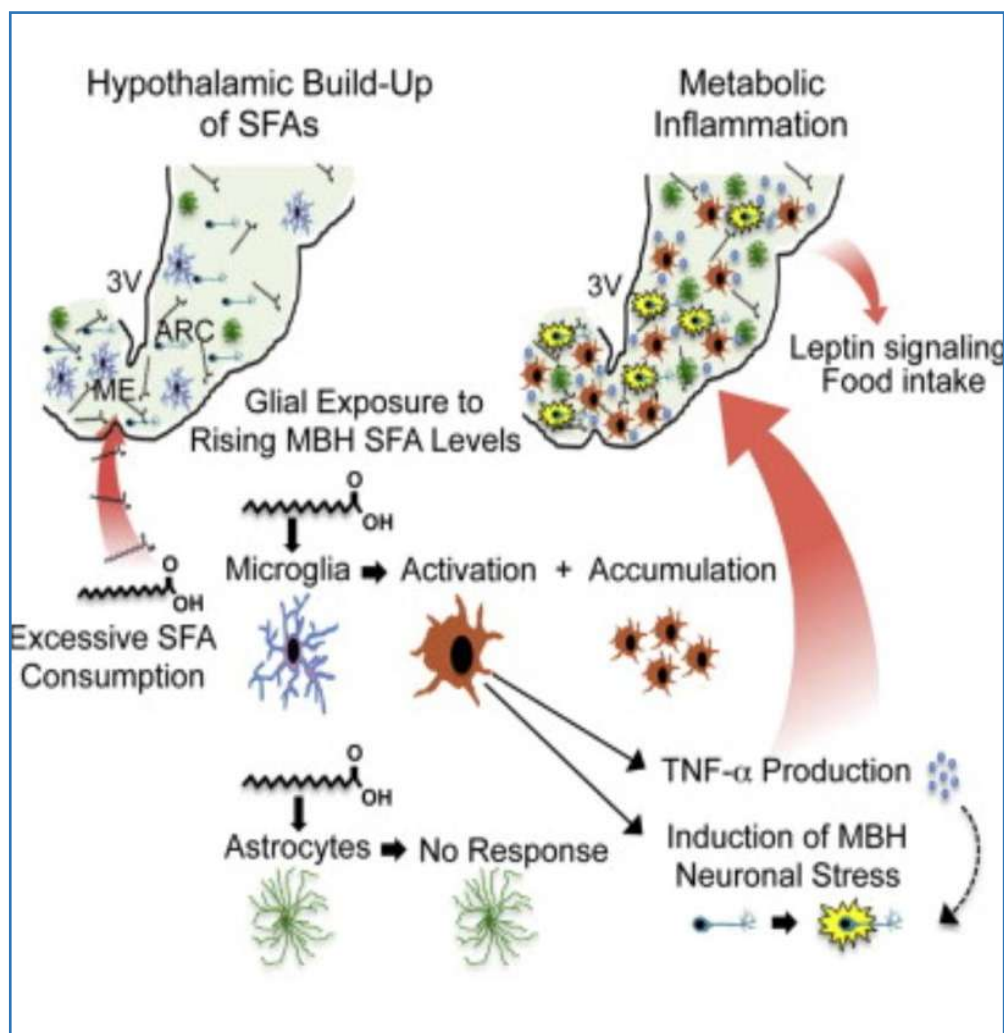


Figura 13. Activación de microglía por detección de ácidos grasos en el ARC. Acumulación de grasas saturadas en ARC del hipotálamo activa la respuesta inflamatoria de la Microglía e induce un estrés neuronal (extraído de Valdearcos., et al 2011).

Las células microgliales desenvuelven en el SNC funciones neurocitoprotectivas o neurocitodegenerativas en función de las necesidades. En condiciones de reposo (ver “restingmicroglia” en la **Figura 14**) la microglía secreta diferentes proteínas (ejemplo: receptor del factor estimulante de colonia 1 –CSF1R–) que participan en la supervivencia de las neuronas (**Figura 14**) (Subramaniam y Federoff 2017). En respuesta a un insulto la microglía sigue una activación clásica (M1 o microglía proinflamatoria) donde actúan como una célula inmune secretando mediadores inflamatorios (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, etc.) que de mantenerse el efecto tiene consecuencias neurocitotóxicos (**Figura 14**) (Subramaniam y Federoff 2017). La misma célula puede sufrir también una fase de activación alternativa, también conocida como M2 o microglía antiinflamatoria. En esta fase, la microglía secreta mediadores antiinflamatorio como factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10) surtiendo efectos neurocitoprotectivos (**Figura 14**). La

microglía puede pasar de la fase M2 a la M1 si no logra solucionar el insulto que origina daño (**Figura 14**) (Subramaniam y Federoff 2017).

El estado de reposo o activación de la microglía es fácilmente detectado a través de la morfología de la célula. En el estado de reposo la célula presenta un soma menor y con ramificaciones claramente marcadas, mientras que en el estado de activación las ramificaciones se contraen ensanchando el cuerpo celular (Diz-Chaves et al. 2012)(**Figura 14**).

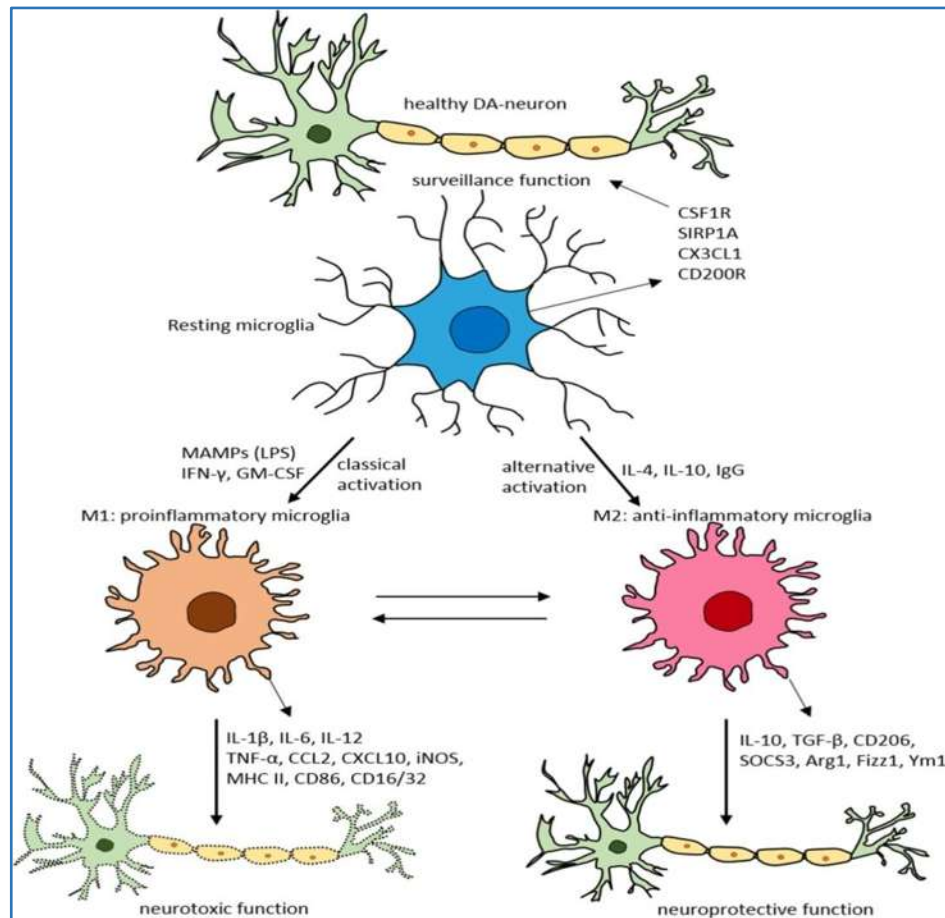


Figura 14. Características morfofuncionales de la microglía dependiente de su estado de activación. Se representa los tipos de activación microglial (la morfología activada es dependiente del insulto al que es expuesta), el fenotipo activado M1(proinflamatorio) secreta mediadores de la inflamación como: $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 y el fenotipo M2 (antiinflamatorio) secreta mediadores antiinflamatorios como: IL-10 , $\text{TGF-}\beta$, CD206 (extraída de (Subramaniam y Federoff 2017)).

3. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos polifenólicos producto de la biosíntesis de plantas a partir de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, la tirosina y el malonato, actuando en estas como metabolitos secundario (Galleano et al. 2012). De acuerdo con su estructura química, la cual consta de un núcleo flavan compuesto de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (**Figura 15**), el grado de oxidación de su heterociclo de oxígeno, así como sus patrones de sustitución, se pueden clasificar en: flavonas, flavonoles, isoflavonas, antocianinas, flavanonas y flavanoles (**Figura 16**)(Veeramuthu et al. 2017).

Los flavonoides son ampliamente estudiados por sus diferentes propiedades, así como por su alta distribución dentro del reino vegetal. Dentro de sus propiedades se establece que tiene una función antioxidante, la cual se puede deber a sus grupo hidroxilos (**Figura 16**) que actúan neutralizando las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros posibles mecanismos(Pietta 2000). También se ha observado que cambiando algunos grupos funcionales los flavonoides conservan y aumentan su capacidad antioxidante (Muhammad et al. 2015; Pietta 2000). De igual manera se han abierto líneas de investigación sobre estos polifenoles en las cuales han observado que tiene una función biológica (bioactividad) sobre varias alteraciones del organismo(Koosha et al. 2016).

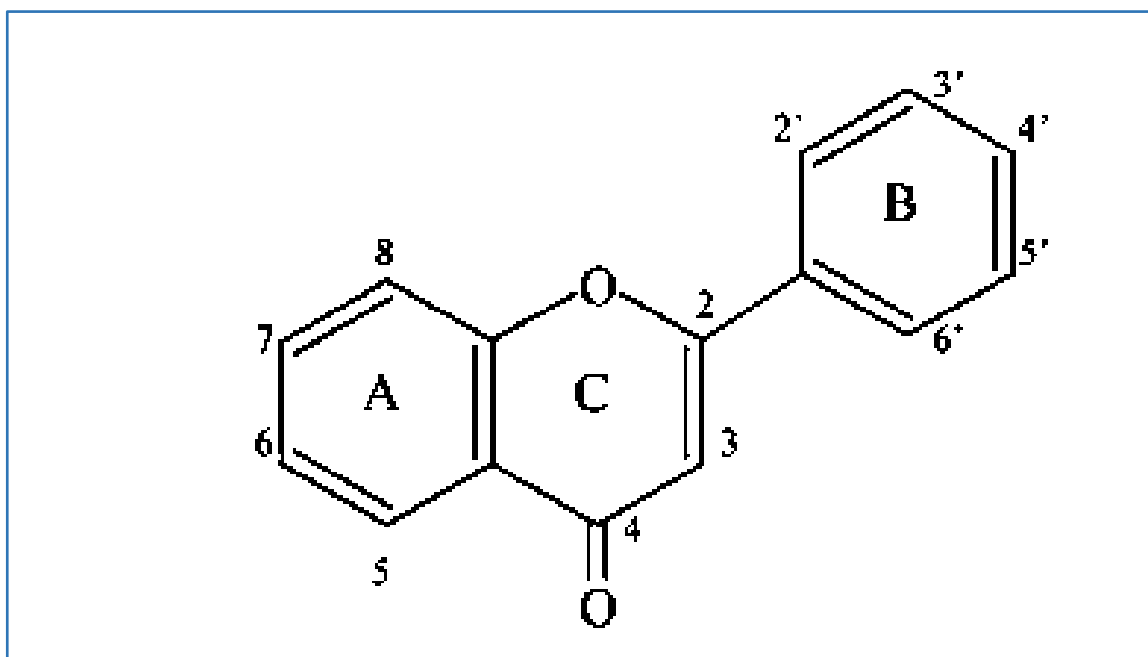


Figura 15. Estructura molecular general de los flavonoides. Dichas moléculas constan de un núcleo flavan compuesto de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos y sustituidos de grupo hidroxilos (extraída de Pietta et al., 2000).

Los flavonoides han mostrado, igualmente, propiedades antiinflamatorias en diferentes líneas celulares, donde actúan disminuyendo la liberación de mediadores de la inflamación como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, entre otros (Kong et al. 2013a). También es conocido su efecto protector en la patogénesis de la obesidad. Han mostrado ser capaces de regular el BE, mejorando el estado de obesidad en modelos experimentales (da-Silva et al. 2007). Aunque los mecanismos aún no son claros podemos esperar que esta combinación de acciones pueda llevar al desarrollo de nuevos tratamientos útiles para el combatir la obesidad y enfermedades relacionadas; para ello es importante desarrollar técnicas de preservación, dada su alta sensibilidad a la degradación por elevada reactividad, de su acción biológica en alimentos y fármacos. Dentro de esta amplia gama de flavonoides los de tipo flavonol como la quercetina y kaempferol (KF) son de gran abundancia en frutas y verduras y son también los más estudiados en el contexto de la inflamación y BE (Torres-Villarreal et al. 2019).

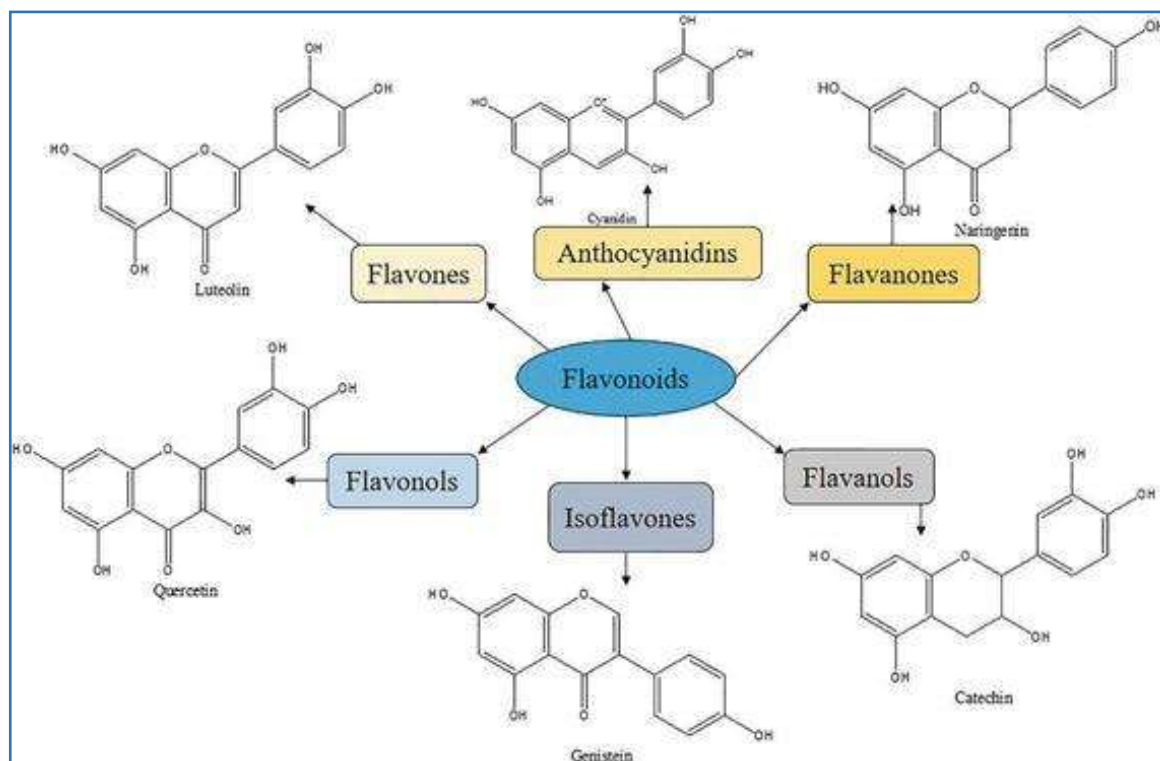


Figura 16. Estructura molecular de los flavonoides con respectivos compuestos como ejemplos. Se muestra varios subgrupos de flavonoides con su anillo flavan, pero con diferente isoforma, así como la posición de sus grupos hidroxilos (extraída de (Veeramuthu et al. 2017)).

3.1. Kaempferol

El KF es un compuesto amarillo de bajo peso molecular (PM 286.23 g/mol), que se encuentra comúnmente en alimentos (frutas y verduras) y en plantas de la medicina tradicional. En plantas actúa como un fitoestrógeno con funciones antioxidantes que brindan protección a la planta, además de intervenir en las relaciones planta-microorganismos (Mierziak, Kostyn, y Kulma 2014). Su síntesis en plantas es muy compleja (**Figura 17**), al igual que otros flavonoides, el KF se biosintetiza a partir de un difenilpropano, que es catalizado por varias enzimas hasta la unión de varios azúcares como: glucosa, ramosa y rutinosa para formar glucósidos (M. Calderon-Montano et al. 2011). Este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal, en varios estudios se ha determinado la cantidad de este flavonoide; entre los alimentos en los que se encuentra mayormente presente tenemos el nopal, brócoli, cebolla, papaya, guayaba, moras, té verde, té negro, así como en bayas comestibles (Miean y Mohamed 2001).

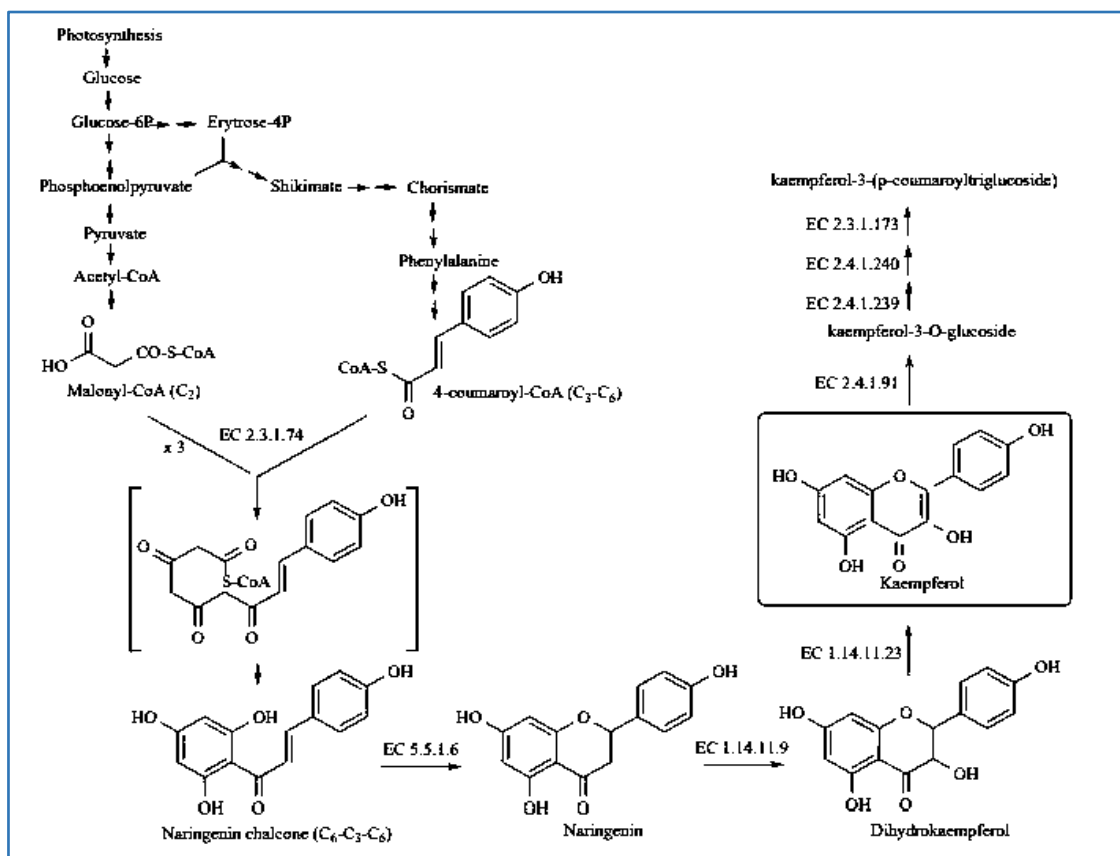


Figura 17. Síntesis y estructura molecular del kaempferol. La biosíntesis comienza a partir de un difenilpropano, el cual se sintetiza por condensación de 4-cumaroil-CoA con tres moléculas de malonil-CoA, la cual es catalizada por la enzima chalconasintasa, cuyo resultado es naringenina flavona, la enzima chalconaisomerasa cataliza el cierre del anillo, la enzima flavonona 3-dioxigenasa introduce un grupo hidroxilo para formar dihidrokaempferol, finalmente la enzima flavonolsintasa agrega un doble enlace en C2-C3 para producir KF (extraída (M. Calderon-Montano et al. 2011).

3.1.1. Kaempferol y su rol en la regulación del metabolismo energético

Además de sus efectos reguladores de la proliferación celular en el cáncer, el KF presenta acciones importantes en la regulación del metabolismo energético (**Figura 18**). Varios estudios han reportado que dietas ricas en polifenoles, entre ellos el KF, tienen un efecto antiobesigénico, atenuando el aumento del PC y metabolitos sanguíneos. En efecto, el consumo de un extracto de té (Sanglan tea), rico en KF y quercetina, suprimió la expresión de genes claves de la lipogénesis y adipogénesis en hígados de ratones obesos (Guruvaiah et al. 2018). Estos datos son consistentes con otro estudio en ratón en el que se implementó una dieta con kaempferol, la cual mejoró la obesidad disminuyendo la adiposidad, los niveles plasmáticos de lípidos, así como una mejora en la resistencia a la leptina e insulina (Zang et al. 2015).

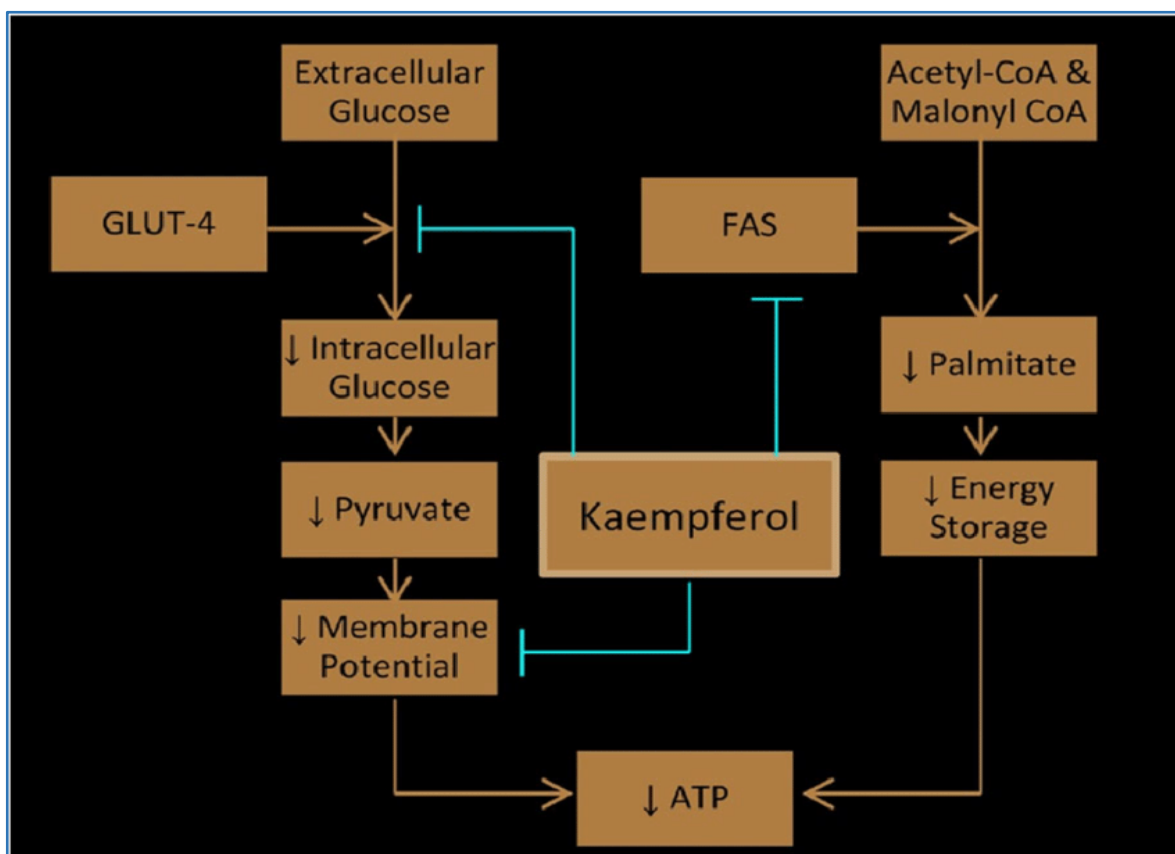


Figura 18. Efecto metabólico del kaempferol, indicando el mecanismo asociado con su función antidiabética, antiobesidad, protección cardiovascular y del daño oxidativo (extraído de Imranet *al.*, 2018).

Los efectos descritos arriba del KF han sido observados igualmente en células aisladas. Así, se ha observado la disminución en la acumulación celular de lípidos; al igual que en estudios en ratones, en cultivo celular se ha observado un aumento de

la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de lípidos(Torres-Villarreal, Camacho, Castro, Ortiz-Lopez, & de la Garza, 2019b).Finalmente, en estudios en células de origen humano se observó una reducción de la adipogénesis mostrando la capacidad del KF para modular el metabolismo en células humanas(Gómez-Zorita et al. 2017).

Por otro lado, la hormona tiroidea es conocida por jugar un rol central en el BE a través de sus efectos sobre la termogénesis. Interesantemente, datos de la literatura muestran al KF como una molécula capaz de regular esta vía de GE dependiente de la termogénesis(da-Silva et al. 2007). En estudios recientes con cultivos celulares de músculo esquelético, se observó que este el KF aumenta el GE al regular genes termogénicos y metabólicos(McAninch y Bianco 2014). Además, aumenta la producción y tiempo de vida media de la desyodinasas 2 (D2), traducándose en un aumento de la activación de la hormona tiroidea, es decir el paso de T_4 a T_3 (da-Silva et al. 2007).

3.1.2. Propiedades antiinflamatorias del kaempferol

Como ya mencionamos, los flavonoides se caracterizan por sus acciones antiinflamatorias; en este sentido, el KF no es una excepción a la regla y muestra una amplia actividad antiinflamatoria inhibiendo o activando diferentes vías intracelulares de señalización (**Figura 19**)(Devi et al. 2015).En efecto, sus propiedades antiinflamatorias han sido extensivamente estudiadas en diferentes tejidos celulares;así, en condrocitos de rata estimulados con IL-1 β , el tratamiento con KF causó una reducción de los mediadores proinflamatorios(Zhuang, Ye, y Huang 2017). Además, una acción del KF ha sido igualmente reportada; en este sentido, se ha observado una modulación de la óxido nítrico sintasa (iNOS), por lo cual se presenta una atenuación de la ciclooxigenasa 2(COX-2), disminuyendo así estos mediadores de la inflamación(Mahat et al. 2010).

El KF ha sido estudiado ampliamente por estas propiedades antiinflamatorias en varios modelos animales, celulares y para varias enfermedades inflamatorias. Dichos estudios mostraron que KF disminuye la liberación de TNF- α e IL-1 β en modelos de aterosclerosis de conejos (Kong et al. 2013b).Otros estudios usando modelos de glaucoma concuerdan con estos resultados en la disminución de mediadores de la inflamación y de los resultados se ha propuesto un posible mecanismos de acción en el cual KF puede inhibir la actividad inflamatoria de las caspasas(Abdullah y Ravanan 2018).

HIPÓTESIS

Dada la reconocida capacidad del kaempferol para regular el gasto energético y la inflamación, ambos procesos relacionados con el desarrollo de obesidad, proponemos que:

El tratamiento con kaempferol mejora parámetros asociados a la obesidad y disminuye el estado de inflamación hipotalámica inducidos por el consumo de una dieta hiperlipídica.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el tratamiento crónico con kaempferol es capaz disminuir el estado de obesidad y su inflamación hipotalámica asociada en ratones expuestos a una HFD.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1.** Establecer la dosis de kaempferol capaz de modular el balance energético.
- 2.2.** Inducir un cuadro de obesidad en ratones.
- 2.3.** Determinar si el tratamiento crónico con kaempferol disminuye el estado de obesidad.
- 2.4.** Evaluar si el tratamiento crónico con kaempferol modula la intolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina.
- 2.5.** Analizar potenciales cambios del estado inflamatorio del hipotálamo inducidos por el tratamiento crónico con kaempferol.
- 2.6.** Determinar si la administración central de kaempferol modula el balance energético.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Todos los experimentos se realizaron en ratones macho de la cepa C57Bl/6J, los cuales se adquirieron en el Instituto de Neurobiología de la UNAM (Juriquilla, Querétaro, México). Los ratones fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12h (inicio de luz a las 07:00) y a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua, a menos que se indique lo contrario. El manejo de los animales se realizó siguiendo estrictamente las pautas del reglamento nacional (NOM-062-ZOO-1999) e internacionales (Institutos Nacionales de Salud) para el cuidado y uso de animales de laboratorio, enfatizando en evitar todo sufrimiento. En cualquiera de los experimentos la dieta (estándar o DHL) en la que se encontraban los animales no fue nunca cambiada.

2. ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS DE KAEMPFEROL CAPAZ DE MODULAR EL BALANCE ENERGÉTICO

Para conocer la cantidad de KF necesaria para modular el BE y así establecer la dosis que se aplicaría en los análisis subsecuentes, realizamos una prueba aguda en ratones no obesos (dieta estándar) siguiendo la estrategia experimental mostrada en la **Figura 20**. Para generar hambre los ratones fueron sometidos a 24h de ayuno y se establecieron 3 grupos (n=6 por grupo) experimentales: Grupo vehículo, Grupo 0.5 mg/kg de KF y Grupo 1 mg/kg de KF. Las dosis de KF referidas fueron inyectadas vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 3.3 mL/kg de peso, usando dimetilsulfoxido (DMSO) como disolvente; la administración de DMSO sin KF constituyó el grupo vehículo.

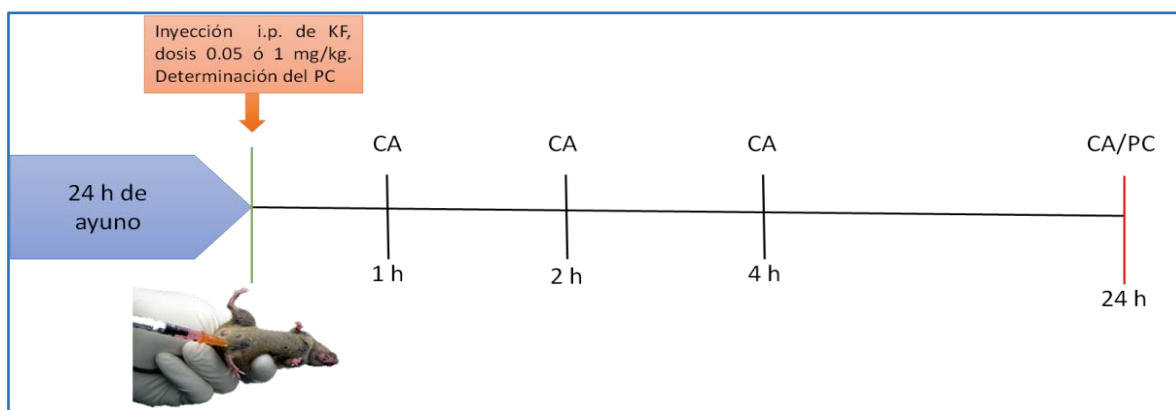


Figura 20. Representación esquemática del diseño experimental para la determinación de la dosis de KF capaz de modular el balance energético. Los animales se sometieron a un ayuno de 24 horas, después se aplicó una dosis i.p. de 0.05 o 1 mg/kg de KF, se evaluó CA y PC 1, 2, 4 y 24 horas post inyección.

La administración de KF fue llevada a cabo justo antes del inicio de la fase oscura y la comida fue regresada a sus jaulas; el CA se determinó 1, 2, 4 y 24h después. Se calculó el consumo absoluto y el consumo normalizado al PC, para el primer caso se ofreció una cantidad de alimento conocida y se pesó la comida restante en los tiempos mencionados con el uso de una balanza (Sartorius, Göttingen, Alemania), la diferencia fue considerada como el consumo absoluto en gramos. Para el cálculo del consumo normalizado al peso corporal se usó la siguiente fórmula: $CA = (\text{gramos de comida ingerida} / \text{peso corporal}) \times 100$. El peso del ratón fue medido antes de comenzar la realimentación y 24h después para calcular el cambio de PC. Se calculó igualmente la eficiencia alimentaria (EA), un indicador de la capacidad del organismo para convertir las calorías consumidas en PC, fue calculada usando la siguiente fórmula: $EA = (\text{ganancia de peso corporal} / \text{calorías ingeridas}) \times 100$.

3. INDUCCIÓN DE UN CUADRO DE OBESIDAD

Para alcanzar el objetivo específico 2, ratones de 8 semanas de edad fueron expuestos por 12 semanas a una dieta hiperlipídica (DHL), donde el 60% de la energía proviene de grasas saturadas (**Tabla 1**). La DHL fue elaborada en base a las DHLs comerciales y a lo establecido por el “*American Institute of the Nutrition*” (AIN-93) para la elaboración de dieta para roedores de laboratorio(Reeves, Nielsen, y Fahey s/f:93). Durante este periodo, el PC y el CA fue monitoreado semanalmente para asegurarse de correcto progreso de la inducción de la obesidad. Cabe mencionar que durante este periodo los animales se encontraron en grupos de 5 ratones por caja, para favorecer su socialización.

Ingrediente	Cantidad (g/kg)	Densidad calórica
Almidón	256	
Sacarosa	100	
Caseína	180	
Celulosa	91	
Goma guar	16	
Manteca de cerdo/Aceite de soya	358	
Mezcla de Minerales	35	
Mezcla de Vitaminas	10	
Fuentes calóricas:		
Proteína		13.4 %
Carbohidratos		26.5 %
Lípidos		60.0 %
Contenido energético (kcal/g)		5.3

Tabla 1. Composición de la DHL. Muestra los ingredientes utilizados para la realización de la dieta y el porcentaje de calorías aportado por cada macronutriente.

De acuerdo a la literatura, un cuadro de obesidad se considera instalado cuando los ratones ganan al menos 10% de PC, llegando a ser obesidad severa si la ganancia de PC supera el 40% de su peso original (Hariri y Thibault 2010). Después de 12 semanas de inducción de obesidad el volumen de masa del ratón aumenta, debido a la acumulación de adiposidad, llegando a un grado de obesidad severa (**Figura 21**).



Figura 21. Imagen ilustrativa de la diferencia fenotípica entre un ratón obeso (arriba) y un ratón normo-peso (abajo) (imagen extraída de Google).

4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE KAEMPFEROL SOBRE EL ESTADO DE OBESIDAD

Para evaluar el efecto del tratamiento crónico con KF sobre el estado de obesidad, se administró este a una dosis de 0.5 mg/kg/día, utilizando como disolvente una solución de 60% de DMSO y 40% de solución salina (NaCl al 0.9% en agua). La inyección del disolvente sin KF se le aplicó al grupo control denominado grupo Vehículo. Para evitar la descomposición del compuesto las soluciones se prepararon bajo luz roja justo antes de la inyección. El compuesto fue administrado durante 40 días por vía i.p. (**Figura 22**); se inyectó dos veces al día, alternando el lado derecho e izquierdo de peritoneo (**Figura 22**), 0.25 mg/kg por la mañana (9:00 am) y 0.25 mg/kg por la tarde (5:00 pm).



Figura 22. Imagen ilustrativa de la técnica y la región anatómica para la inyección i.p. (imagen extraída de Google).

La estrategia experimental para esta parte del estudio se ilustra en la **Figura 23**. Dada la cronicidad del experimento, mucho cuidado se tuvo para evitar el estrés y daño tisular. En este sentido, la cantidad de volumen inyectado fue de 2 mL/kg (50µL/25g de ratón), usando jeringas de insulina de 0.5 ml (50 unidades) (DB ultra-fine 6mm). Durante una semana, previo al inicio del tratamiento, los ratones fueron inyectados diariamente con solución salina para habitar a los ratones a la manipulación y disminuir estrés al inicio de la inyección con KF. Ambos grupos, Vehículo y KF, se compusieron guardando un promedio de PC similar. Durante el tratamiento los animales fueron mantenidos en cajas de manera individual. A lo largo del tratamiento se registró el PC, para determinar el cambio del PC, usando la formula $\text{Cambio de PC} = \text{PC}_{\text{final}} - \text{PC}_{\text{inicial}}$. El CA absoluto y normalizado al PC (g de alimento consumido/g peso corporal X 100), fueron igualmente determinados. La EA fue calculada usando la fórmula anteriormente mencionada. Todas las medidas fueron realizadas a las 09:00 am.

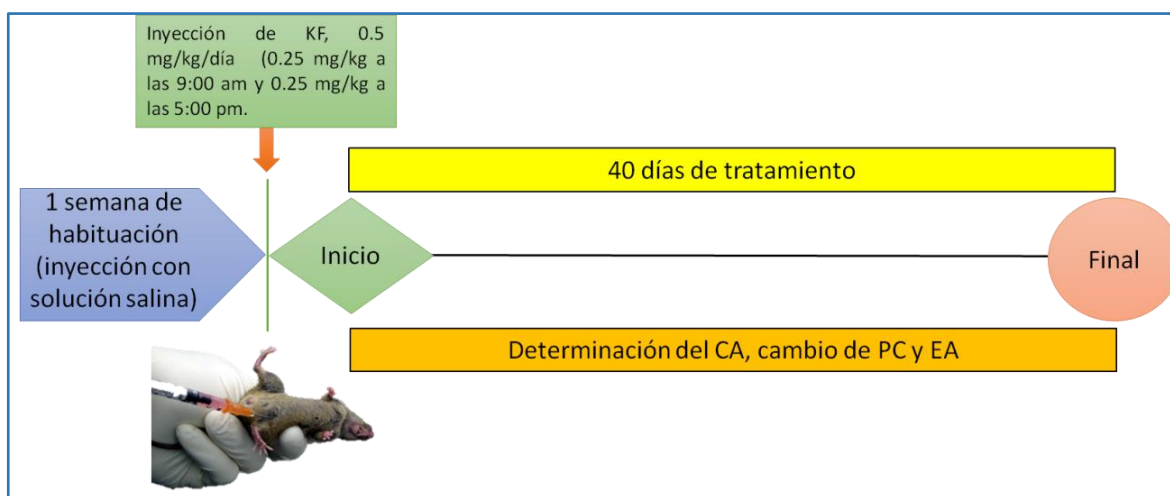


Figura 23. Representación esquemática del diseño experimental para la determinación del efecto del tratamiento crónico con KF sobre el estado de obesidad. Se realizó un semana de habituación con solución salina al 0.09%, después se inició el tratamiento de KF i.p. a una dosis de 0.025 mg/kg, a dos horas del día (9:00 a.m. y 5:00 p.m.), durante 40 días en los cuales se evaluó CA Y PC.

4. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KAEMPFEROL SOBRE LA INTOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA

Para determinar si el tratamiento con KF mejora el metabolismo de la glucosa en ratones obesos, un test de tolerancia a la glucosa (TTG) y un test de tolerancia a la insulina (TSI) fueron realizados a los días 32 y 38 de tratamiento, respectivamente. Ambas pruebas son parámetros alterados por la obesidad y se comparó la respuesta en animales obesos Vehículo y KF. El protocolo de cada prueba se describe en los

puntos siguientes, señalando que las pruebas fueron hechas con el cuidado necesario para evitar al máximo el estrés y todo sufrimiento de los animales.

4.1. Test de tolerancia a la glucosa

Esta prueba se realizó en el día 32 del tratamiento procediendo como se describe a continuación (**Figura 24**). Los ratones se sometieron a ayuno por 6 horas, después se determinó la glicemia basal(punto 0) tomando una gota de sangre de la vena de la cola a través de un corte mínimo del extremo de la cola del animal y usando un glucómetro (Accu-check, Roche, México). Acto seguido, se les administró(i.p.) una carga exógena de glucosa de 2g/kg (Meyer, México), la cual fue disuelta en solución salina utilizando una jeringa de insulina. La glicemia fue igualmente (sin hacer nuevo corte de la cola) determinada 15, 30, 45, 60 y 120 min después de la carga de glucosa.

4.2. Test de sensibilidad a la insulina

En el día 38 del tratamiento, un TSI fue practicado (**Figura 24**). Los ratones se sometieron a 6 horas de ayuno, posteriormente se tomó la glicemia del punto 0, de la misma manera que en el TTG. Enseguida se les administro i.p. una carga exógena de insulina de 1 U/kg (AMSA, México) que se disolvió en solución salina. En consiguiente se tomaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 15, 30, 45, 90 y 120 min, procediendo de la misma manera que en el TTG.

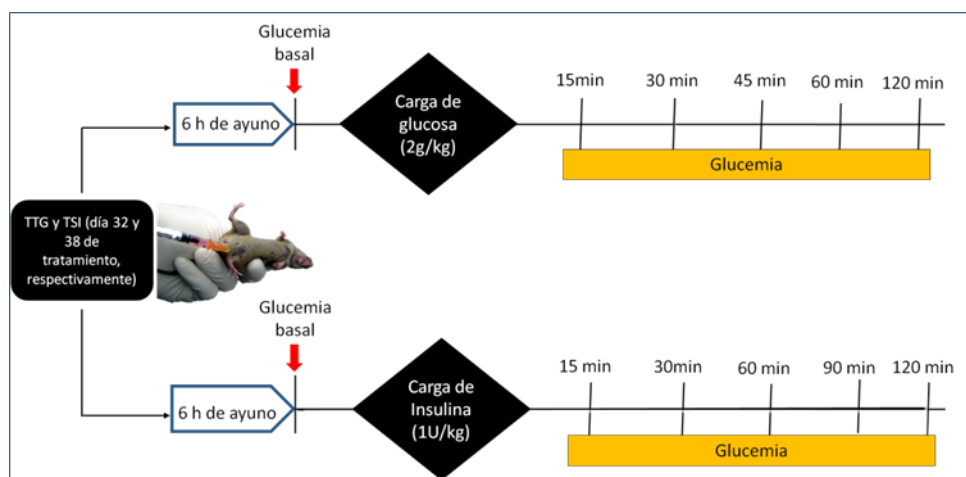


Figura 24. Representación esquemática del diseño experimental para las pruebas TTG y TSI realizadas en ratones obesos tratados crónicamente con KF. Los animales se sometieron a un ayuno de 6 horas en ambos test, posteriormente se tomó una muestra de sangre basal, a lo que enseguida se aplicó una carga exógena de glucosa de 2g/kg (en el caso del TTG) o una dosis de insulina de 1U/kg (en el caso del TSI), se tomaron muestra de sangre al minuto 15, 30, 45, 60 y 120 (TTG) y 15, 30, 60, 90 y 120 (TSI). Las pruebas se realizaron en diferentes semanas.

5.EVALUACIÓN DE POTENCIALES CAMBIOS DEL ESTADO INFLAMATORIO HIPOTALÁLMICO INDUCIDOS POR EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KAEMPFEROL

Para la evaluación de este punto, el cual consiste en detectar un cambio en la inflamación hipotalámica, se realizaron una serie de pasos método lógicos que se describe en detalle en los siguientes apartados.

5.1. Perfusión de los animales

A los animales se les dejó en ayuno durante 1 hora antes del sacrificio, para homogenizar al máximo el estado metabólico. Para el sacrificio se utilizó una dosis de eutanasia de 200mg/kg de pentobarbital sódico (Sedalphorte, México). Una vez profundamente dormidos se les abrió desde la caja torácica hasta el vientre y se expuso el corazón para ser perfundidos (**Figura 25**). A través del ventrículo izquierdo se llevó a cabo la perfusión intracardiaca, la cual se realizó primero con solución salina durante diez minutos para eliminar la sangre y después con una solución fijadora de paraformaldehído (PFA)(Sigma, México) al 4% en PBS (tampón fosfato salino) a una temperatura de 4°C. En seguida, se recolectó el cerebro perfundido y se colocó en PFA(4% en PBS) durante 24 horas (pos-fijación). Después se colocaron en solución de sacarosa al 20% durante 24 horas y para terminar se incubaron a 4°C en solución de sacarosa al 30% hasta depositarse los encéfalos en el fondo del recipiente (deshidratación).

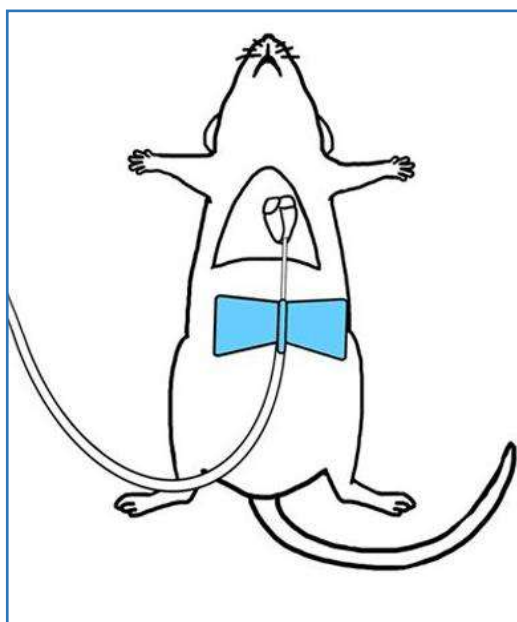


Figura 25. Imagen ilustrativa del proceso de perfusión. Muestra una cateterización en ventrículo izquierdo del corazón, por donde se harán los lavados de tejido, en primer paso con solución salina al 0.09% y en segundo paso con paraformaldehído al 4%.

5.2. Cortes histológicos

Se realizaron cortes coronales histológicos a los cerebros previamente perfundidos y deshidratados. Para ello, se utilizó un criostato manual, con el cual se recolectaron cortes de hipotálamo conteniendo el ARC (guiados por un atlas cerebral de ratón)(Figura 26).El espesor de los cortes fue de 30 μ m, y fueron recolectados de manera seriada en seis tubos conteniendo solución crioprotectora(50% etielinglicol/50% glicerina) y guardados hasta el uso a -20°C.



Figura 26. Imagen ilustrativa del proceso de obtención de cortes en criostato (izquierda) del ARC (círculo rojo, derecha).

5.3. Marcación inmunohistoquímica de la microglía

Para determinar la densidad de microglía (número de células/área) y su nivel de activación, se procedió a la realización de la inmunodetección de la proteína “*ionizedcalcium-binding adapter molecule 1*”(Iba-1), un marcador de células microgliales. Se tomaron cortes de hipotálamo comprendiendo al menos 3 con ARC.

Los cortes fueron lavados 3 veces por 10min con tampón de fosfatos (PB) 0.1M a temperatura ambiente (TA), con la finalidad de eliminar la solución crioprotectora. Posteriormente se incubaron con H₂O₂ 10% en metanol durante 30 min y luego en H₂O₂ 10% en tampón de fosfato (0.1M, pH=7.4) con Tritón X-100 (Sigma, EE. UU) al 3% por 15 min a TA. Después, los cortes fueron lavados con PB (3 x 10 min) e incubados en seguida por 30 min a TA en solución de bloqueo conteniendo Suero de caballo (Sigma, EE. UU) al 5% en PB. En seguida fueron incubados por 48h a 4°C con el anticuerpo primario anti-Iba-1 generado en conejo (Wakochemicals, Japón) en una dilución de 1:15000 en PB. Al día siguiente, los cortes fueron lavados con PB (3 x 10 min) a TA. Luego fueron incubados por 1h a TA con un anticuerpo secundario generado en ratón, biotinilado anti-conejo (Sigma, EE. UU), diluido 1:750 en PB. A esto le siguió un lavado con PB (3 x 10 min) e incubados con soluciones conteniendo el complejo avidina-biotina (Vector laboratorios, EE. UU), siguiendo las

recomendaciones del fabricante. Para eliminar el exceso de complejo avidina-biotina, los cortes fueron lavados a TA con PB (3 x 10 min). La tinción de la microglía fue luego desarrollada usando el kit DAB (Vector laboratorios, EE. UU), basado en la diaminobenzamidina como colorante, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Luego de un lavado a TA con PB (3 x 10 min), los cortes fueron montados en láminas cubiertas con 1% de gelatina, cubiertas con cubreobjetos usando Cytoseal (ThermoScientific, EE. UU) como medio de montaje. Las láminas se dejaron secar por 24h a TA antes de iniciar el análisis y captura de microfotografías. En la realización de los inmunomarcajes se tuvo la precaución de incluir en cada sesión el mismo número de animales de cada grupo, para evitar que efectos asociados al procedimiento de análisis pudieran comprometer la comparación entre estos.

5.4. Determinación del número y estado de activación de la microglía

Esta determinación se basó en un análisis de las características morfológicas de la microglía, las cuales reflejan el estado de activación o reposo de la célula. De esta manera, a partir de los cortes inmunomarcados con anti-iba-1 se tomaron microfotografías de ambos lados del ARC con amplificación 20X usando un microscopio eléctrico acoplado a una cámara de transmisión en vivo (Ziess, Alemania). Para evitar sesgo las microfotografías se tomaron en ciego, es decir, sin saber a qué animal correspondían los cortes, el código (la correspondencia de las muestras) fue conocido después del análisis morfológico. La activación de la microglía se analizó en el ARC a partir de las microfotografías obtenidas, usando el programa computacional *AxioVision 2.0* (Ziess, Alemania). El estado de activación de la microglía fue considerado de acuerdo a los criterios señalados por (Diz-Chaves et al. 2012). Estos autores consideran como microglía en reposo la morfología representada por las fases I, II y III y como microglía activada la morfología de las fases IV y V (**Figura 27**).

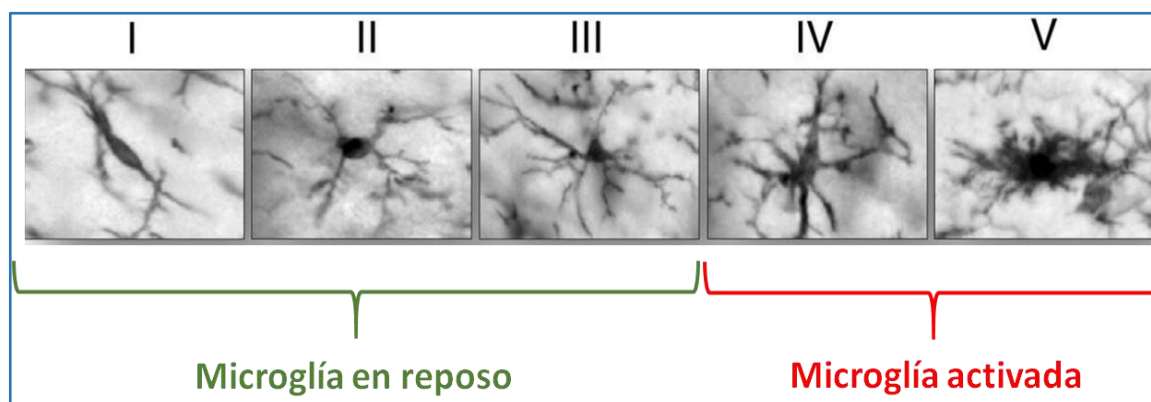


Figura 27. Imagen ilustrativa del estado de reposo (I, II, III) y de activación (IV, V) de la microglía basado en su morfología (adaptación de (Diz-Chaves et al. 2012).

Para el conteo se tomó una área uniforme en todos los cortes de 0.1669 mm² comprendida en el ARC (**Figura 28**), dicho conteo se realizó de la misma manera en el lado opuesto del ARC. En conteo se llevó a cabo en tres cortes del hipotálamo conteniendo ARC y se determinó: 1) la densidad de microglía (número de microglías/mm²), 2) densidad de microglía activada y 3) el porcentaje de células activadas. En todos los casos se consideró la sumatoria de células presentes en ambos lados del ARC de los tres cortes contabilizados.

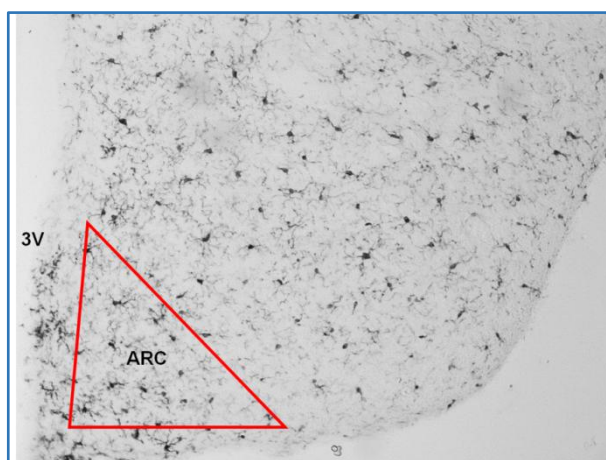


Figura 28. Imagen ilustrativa del área del ARC (triángulo en rojo) donde se determinó el nivel de activación de la microglía. Puntos irregulares en negro corresponden a microglías inmunomarcadas.

6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO

6.1. Canulación

Para establecer la capacidad del KF de modular centralmente el BE a ratones con 12 semanas de inducción de obesidad se les implanto estereotáxicamente una cánula de acero inoxidable (Plasticsone, Inglaterra) en el ventrículo lateral derecho (coordenadas: antero-posterior -0.5 mm; medio-lateral -1.2 mm y dorso-ventral -2.1 mm, del bregma) (**Figura 29**). Dicha cirugía se llevó a cabo en ratones anestesiados con Ketamina (100mg/kg)(Sedalphorte, México) y Xilazina(10mg/kg) (Pisa, México)inyectados vía i.p. Durante los 4 días posteriores a la cirugía, los ratones recibieron analgésico en el agua (paracetamol 2mg/100mL). La correcta implantación de la cánula fue verificada *post mortem* por análisis histológico.

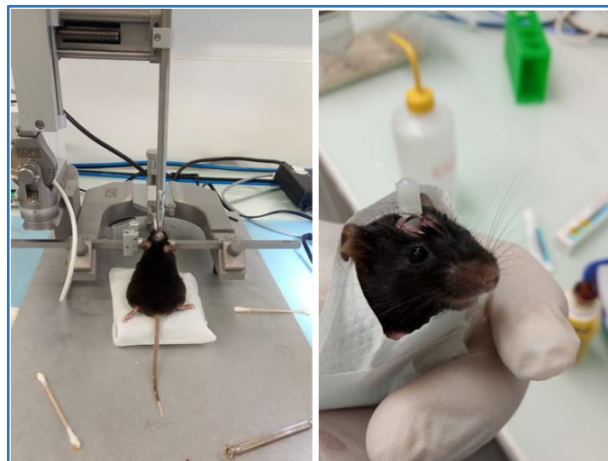


Figura 29. Imagen ilustrativa de la implantación de la cánula en el ventrículo lateral derecho. Muestran el esterotaxico ocupado durante la cirugía para la implantación de cánulas en el ventrículo lateral derecho, con la cual posteriormente se realizó la inyección intra cerebro ventricular de KF.

6.2. Evaluación farmacológica del efecto de la administración central de kaempferol sobre el balance energético

Después de dos semanas de recuperación posoperatoria, los ratones se pusieron en ayuno por 24h y en el cambio de la fase de luz (clara a oscura) se les inyectó vía intracerebroventricular (i.c.v.) 5 μ g de KF. La dosis fue elegida en base a observaciones previas en nuestro equipo de investigación las cuales mostraron un efecto sobre el BE de compuestos similares, usando la misma dosis. Luego de la inyección la comida fue regresada a sus jaulas y el CA se midió a 1, 2, 4 y 24h después de la inyección (**Figura 30**), con el uso de una balanza (Sartorius, Alemania). El PC fue medido antes de comenzar la realimentación y 24h después para calcular el cambio de peso (**Figura 30**). La EA fue calculada usando el consumo calórico y el cambio de peso, como se mencionó previamente.

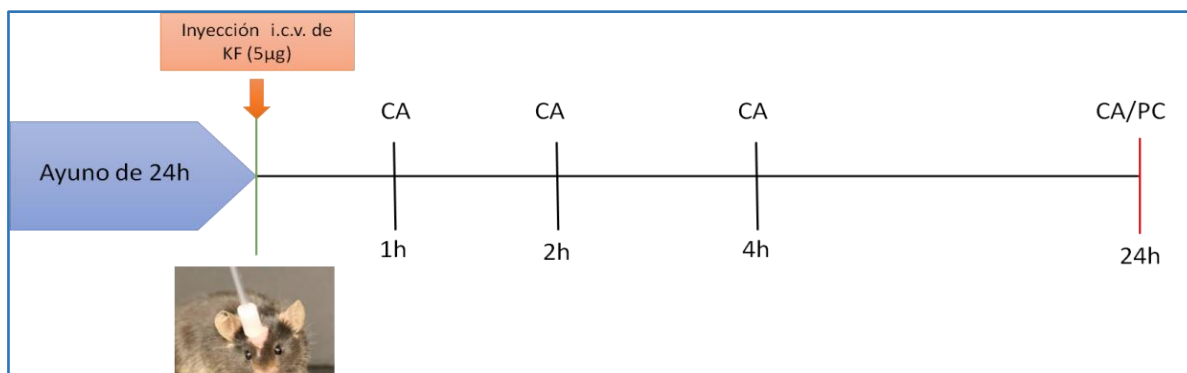


Figura 30. Representación esquemática del diseño experimental para la determinación del efecto de la administración central de kaempferol sobre el balance energético. Esta aplicación fue i.c.v. de KF a una dosis de 0.05 mg/kg, en la cual los animales tuvieron un ayuno de 24; se evaluó CA y PC 1, 2, 4 y 24 horas post inyección.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados usando las pruebas: 1) t de Student para la comparación de medias entre dos grupos, 2) análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar medias entre 3 grupos, 3) ANOVA de dos vías para comparar grupos considerando los factores tratamiento y tiempo. Cuando se encontró diferencia significativa entre grupos el post-test de Bonferroni fue aplicado para múltiples comparaciones. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos. Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico GraphPadPrism6 (La Jolla, California, EE. UU).

RESULTADOS

1. ESTABLECIMIENTO DE LA DOSIS DE KAEMPFEROL CAPAZ DE MODULAR EL BALANCE ENERGÉTICO

Con el objetivo de determinar la dosis de KF necesaria para modular BE, se administró vía i.p. 0.5 ó 1 mg/kg a ratones alimentados con dieta estándar (normo-peso) y se evaluó el efecto agudo sobre el cambio de PC, CA y EA. Los resultados mostraron que la administración de ambas dosis llevan a una tendencia a reducir la ganancia de PC con la realimentación (**Figura 31A**), esto sin cambios en el CA en ninguna punto de medición (**Figura 31B y 31C**). Interesantemente, los animales tratados con KF exhibieron una disminución de la EA, siendo esta significativa con la dosis de 0.5 mg/kg (**Figura 31D**). Los resultados de este análisis de tratamiento agudo muestran que KF es capaz de reducir la EA, sin cambios en CA. Estos resultados sugieren que un tratamiento crónico con KF sería capaz de mejorar el estado de obesidad.

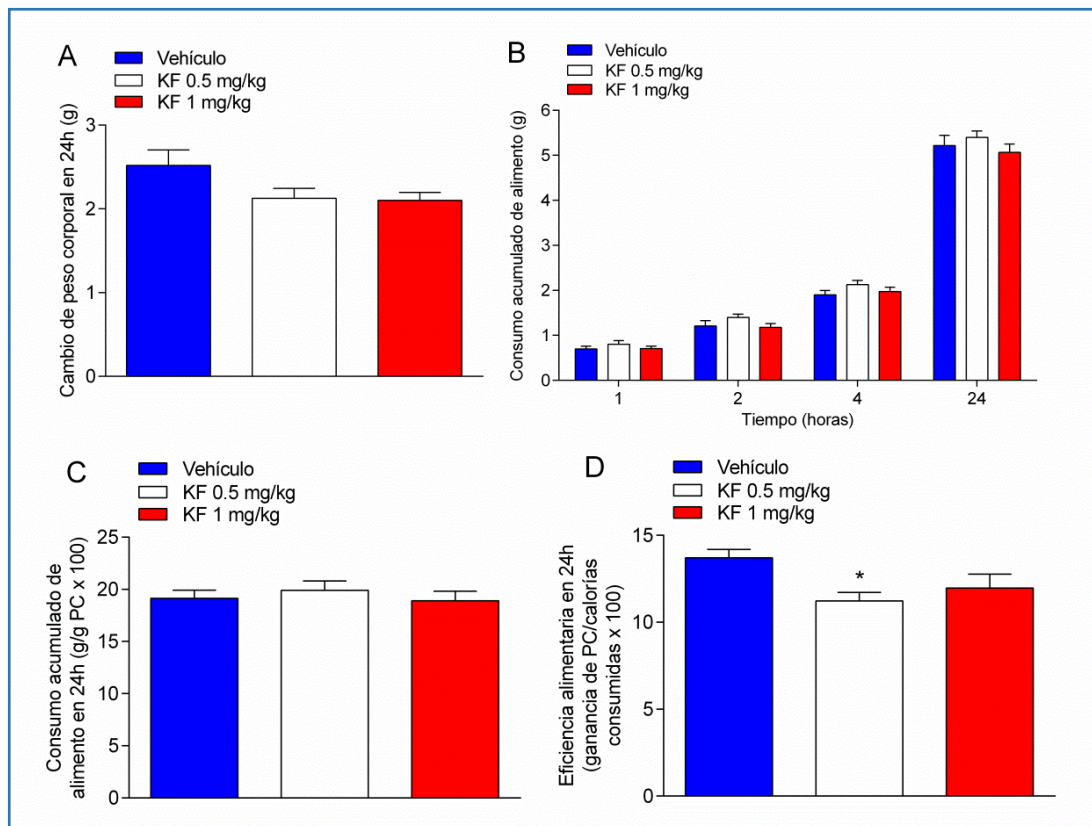


Figura 31. Efecto del tratamiento agudo (24h, i.p.) con KF sobre el BE. Se evaluó el cambio de PC (A); el CA acumulado a 1, 2, 4 y 24h después de la inyección (B); el CA normalizado al PC (C) y la EA (D). Los ratones fueron normo-peso tratados con vehículo (barra azul), 0.5 mg/kg de KF (barra blanca) ó 1 mg/kg (barra roja). Los datos fueron analizados con una ANOVA de una vía (A, C y D) y con ANOVA de dos vías (B), aplicando el post-test de Bonferroni. * $p < 0.5$, $n = 6$ ratones/grupo.

2. INDUCCIÓN DE LA OBESIDAD

El modelo en ratón de obesidad inducida por dieta está ampliamente validado en la literatura (Hariri y Thibault 2010). Luego de la exposición a la DHL los ratones comenzaron a ganar PC desde la primera semana (**Figura 32A**), continuando la ganancia progresivamente hasta casi duplicar el PC en la semana 12. En términos de porcentaje los ratones ya presentaban una obesidad leve (ganancia de PC del 10%), la cual se fue consumando a lo largo de las semanas hasta llegar a una obesidad severa al final de las 12 semanas, 80% más de PC comparado con el PC al inicio de la inducción (**Figura 32B**).

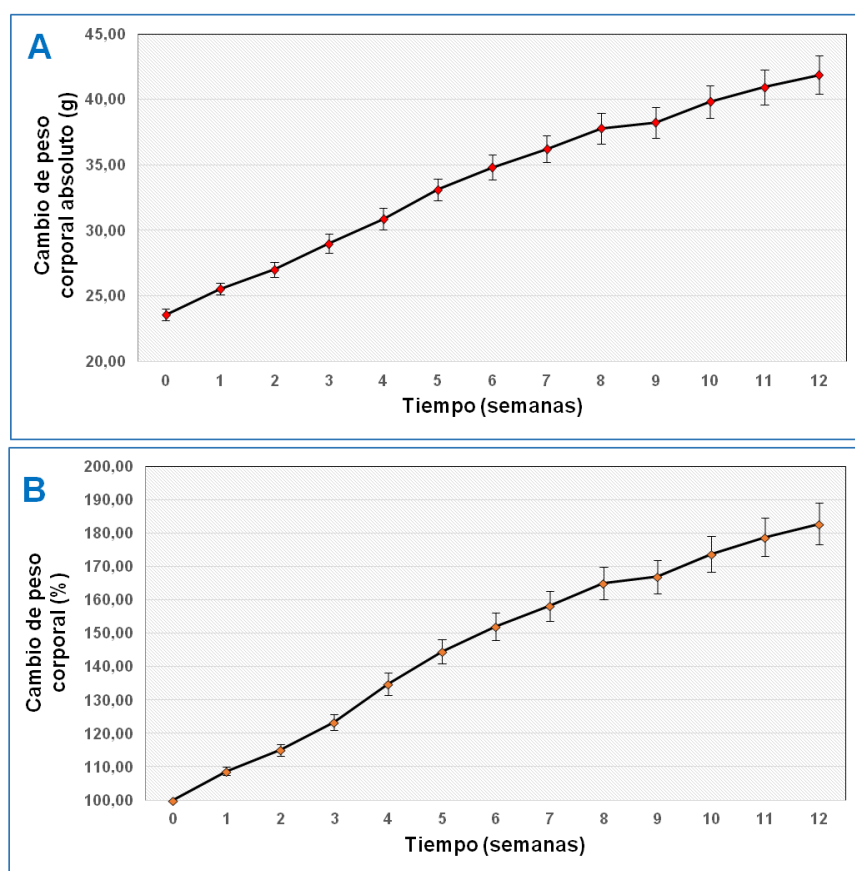


Figura 32. Inducción de un estado de obesidad en ratones. Evolución semanal del PC absoluto durante 12 semanas de consumo de DHL (A) y cambio del PC en porcentaje (B). n=18 ratones.

3. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES OBESOS

Nos propusimos a evaluar si el tratamiento crónico con KF era capaz de mejorar el estado de obesidad dada su capacidad de regular BE observada. A partir de la observación de la prueba en agudo, donde 0.5 mg/kg era capaz de modular la EA,

decidimos administrar la misma dosis en este estudio. Considerando su corto tiempo de vida media, se decidió administrar los 0.5 mg/kg inyectando 0.25 mg/kg de KF por la mañana (9:00 am) y otro tanto por la tarde (5:00 pm). Los resultados obtenidos mostraron que los animales tratados con vehículo mantuvieron su PC al final del estudio, mientras que el grupo tratado con KF presentó una pérdida significativa de PC (**Figura 33A**). Al igual que en el estudio en agudo, en animales normo-peso, el KF no tuvo efecto sobre el CA. El CA acumulado tendió a disminuir (**Figura 33B**), sin embargo, se debió a la pérdida de PC ya que normalizando al PC el consumo promedio de 24h no se observa la tendencia (**Figura 33C**). La EA fue lógicamente (debido a la pérdida de PC sin cambios en el CA) significativamente reducida por el KF (**Figura 33D**).

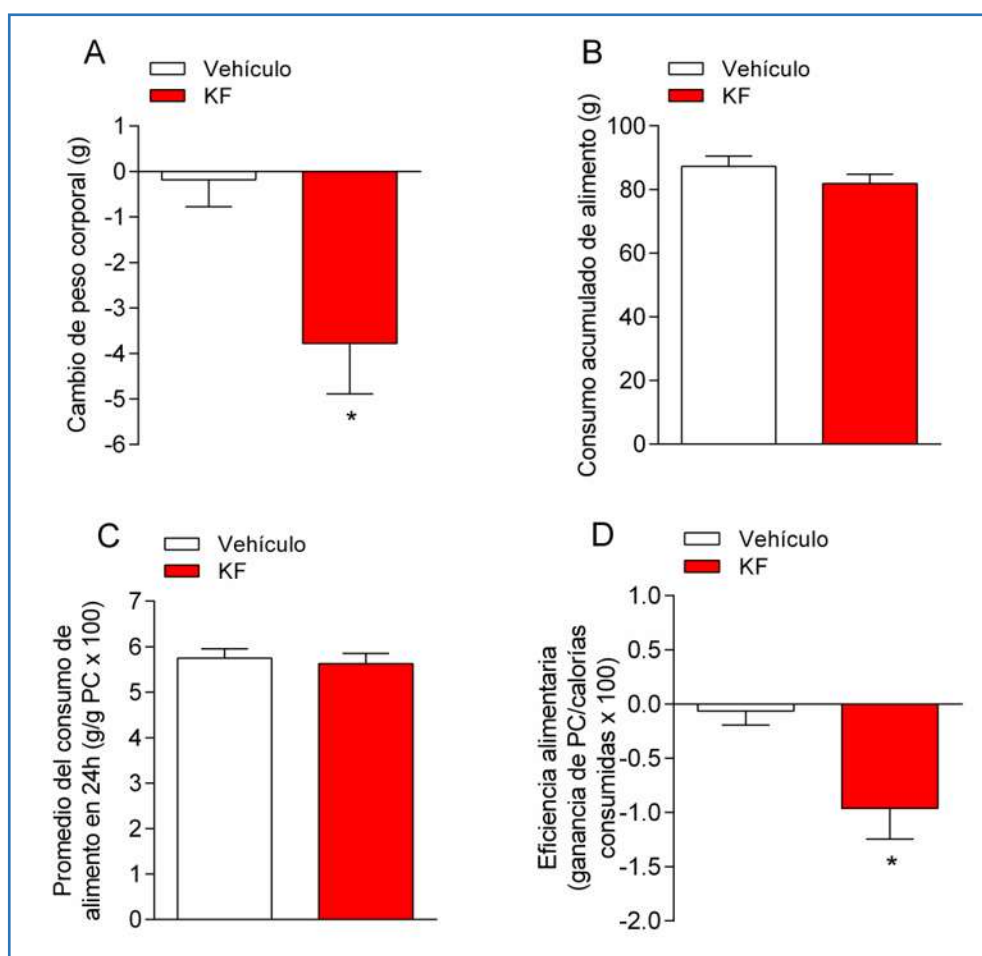


Figura 33. Efecto del tratamiento crónico con KF sobre el BE en ratones obesos. Los animales obesos fueron inyectados diariamente (2 veces/día), por 40 días, con solución Vehículo (barra blanca) ó 0.25 mg/kg de KF (barra roja). Se evaluó el cambio de PC al término del tratamiento ($PC_{final}-PC_{inicial}$) (A), el CA acumulado durante el estudio (B), el CA promedio diario normalizado al PC (C) y la EA de los 40 días de tratamiento (D). Los datos fueron analizados con una prueba t de Student. * $p<0.05$, n=6-7 ratones/grupo.

4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON KF SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN RATONES OBESOS

Uno de los parámetros mas alterados por la obesidad es la baja tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. En este sentido, se evaluó si KF es capaz de mejorar dichos parámetros. Los datos muestran que el tratamiento con KF no tiene efecto sobre la tolerancia a la glucosa (**Figura 34A y 34C**), ni sobre los niveles basales de glucosa plasmática (**Figura 34B**). En cambio, dicho tratamiento tendió a mejorar ($p=0.67$) la respuesta a la insulina (**Figura 34D y 34F**). Interesantemente, a tales alturas del tratamiento con KF (día 38) los animales tratados presentaron niveles plasmáticos de glucosa significativamente reducidos, comparados con los animales Vehículo (**Figura 34E**).

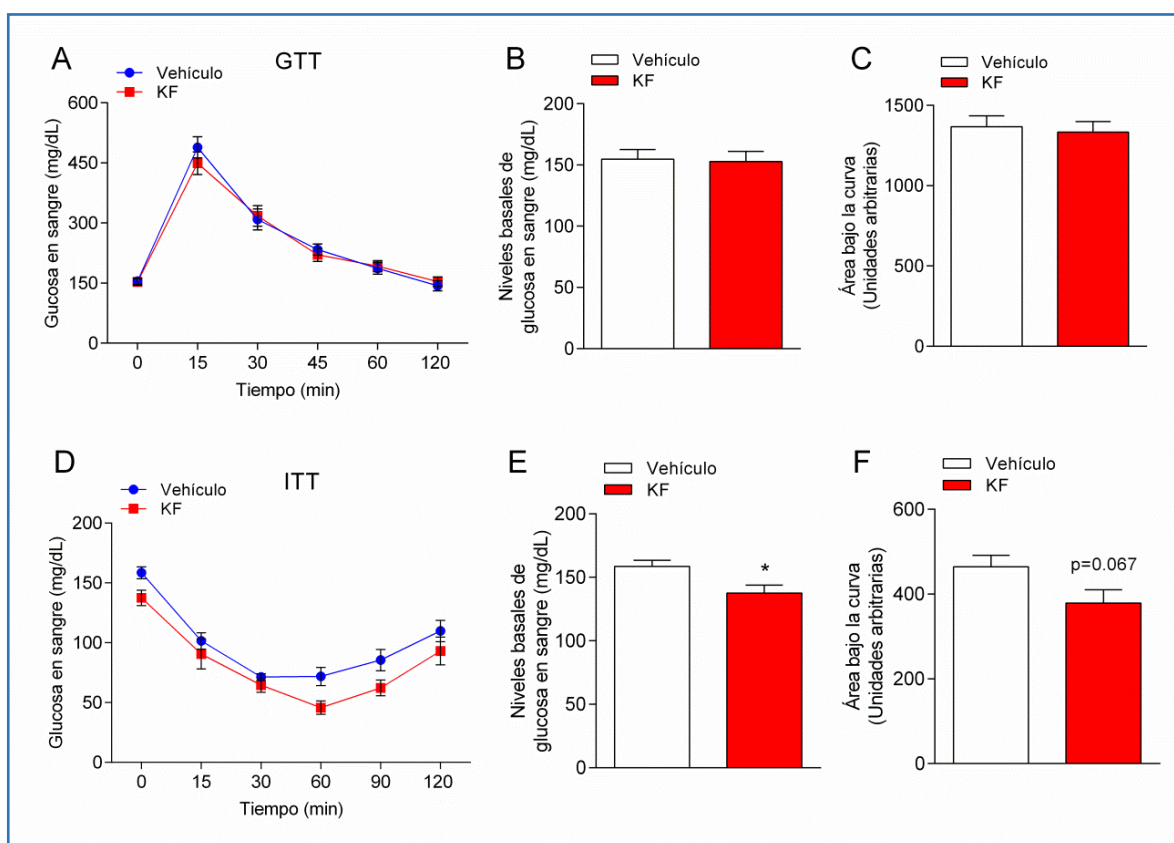


Figura 34. Efecto del tratamiento crónico con KF sobre la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina. Al día 32 de tratamiento los ratones del grupo Vehículo (línea azul) y grupo KF (línea roja) fueron sometidos a un TTG (A) con una carga exógena (i.p.) de glucosa (2 mg/kg). La glicemia basal del grupo Vehículo (barra blanca) y el grupo KF (barra roja) es mostrada en el panel (B); el área bajo la curva es presentada en el panel (C). El mismo procedimiento fue ejecutado para un TSI (1U/kg) al día 38 del tratamiento con KF (D). Su respectiva glicemia basal y área bajo la curva son mostradas en los paneles (E) y (F). Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías (A) y (D), seguido de del post-test de Bonferroni, y con una prueba t de Student para el resto de las comparaciones. * $p<0.05$, $n=6$ ratones/grupo.

5. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA CON KF SOBRE EL ESTADO INFLAMATORIO DEL HIPOTÁLAMO

La obesidad asociada a una inflamación hipotalámica es un campo de estudio reciente y de gran interés, por lo cual nos preguntamos si KF era capaz de atenuar dicha inflamación. Dado el rol central que juega el ARC en la regulación del BE, nos enfocamos a determinar el grado de inflamación en dicho núcleo hipotalámico. Los resultados obtenidos muestran que KF induce una tendencia a disminuir el número total de microglías en el ARC (**Figura 35B y 35D**) comparado al grupo Vehículo (**Figura 35A y 35D**). Interessantemente, dicho tratamiento llevo a una reducción significativa del número total de células activadas (**Figura 35B y 35E**) y en el porcentaje de las mismas (**Figura 35F**).

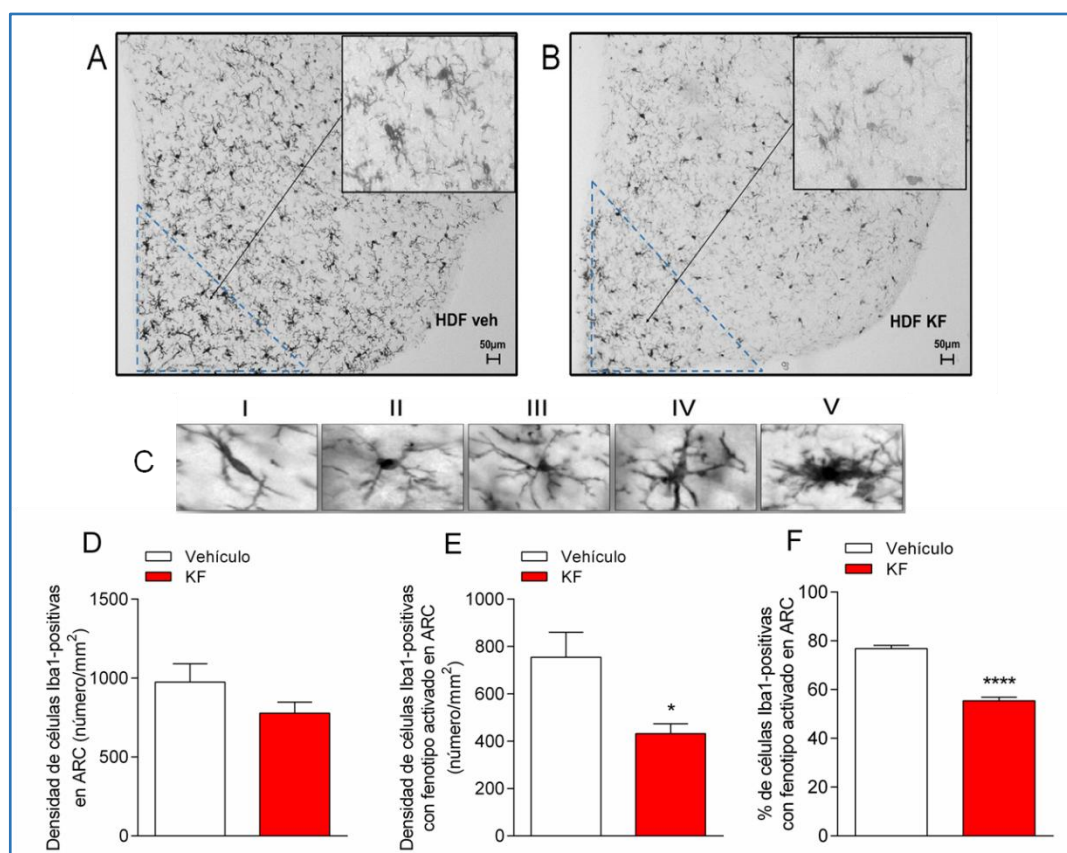


Figura 35. Efecto de la administración crónica con KF sobre el estado inflamatorio del hipotálamo. Los análisis inmunohistoquímico fueron realizados en cortes de cerebro obtenidos de ratones obesos tratados con Vehículo (panel A y barras en blanco) ó 0.5 mg/kg (panel B y barras en rojo). Se determinó el número total de células Iba-1 positivas (microglía) (D), el número total de células microgliales activadas (E) y el porcentaje de microglía activada [(microglía activada/microglía total) X 100] (F). La microglía se consideró activada cuando presentaba una morfología correspondiente a la fase IV y V (C), de acuerdo a Diz-Chaves *et al.*, (2012). Imágenes representativas del nivel de inflamación (activación de la microglía) del grupo Vehículo y KF son ilustradas en (A) y (B), respectivamente. Los datos fueron analizados con una prueba t de Student. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$. $n = 6$ ratones/grupo.

6. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CENTRAL DE KF SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATONES OBESOS

Dado los resultados obtenidos en los análisis previos nos propusimos establecer si el KF es capaz de modular el BE actuando a nivel central. Para ello nos dimos a la tarea de evaluar el efecto agudo de su administración i.c.v. sobre el BE en ratones obesos expuestos a DHL. Los resultados mostraron que la administración i.c.v. de 5 μ g de KF reduce la ganancia de PC durante las 24h de realimentación comparado con el grupo Vehículo (**Figura 36A**). Con respecto al CA, 2h después de la administración de KF los animales mostraron una tendencia a disminuir el consumo de alimento (**Figura 36B**). Sin embargo, El CA absoluto acumulado (**Figura 36B**) o normalizado al PC (**Figura 36C**) no presentó modificación por el KF. Lo anterior llevó a reflejar una disminución de la EA (**Figura 36D**) en el grupo KF comparado con el grupo Vehículo.

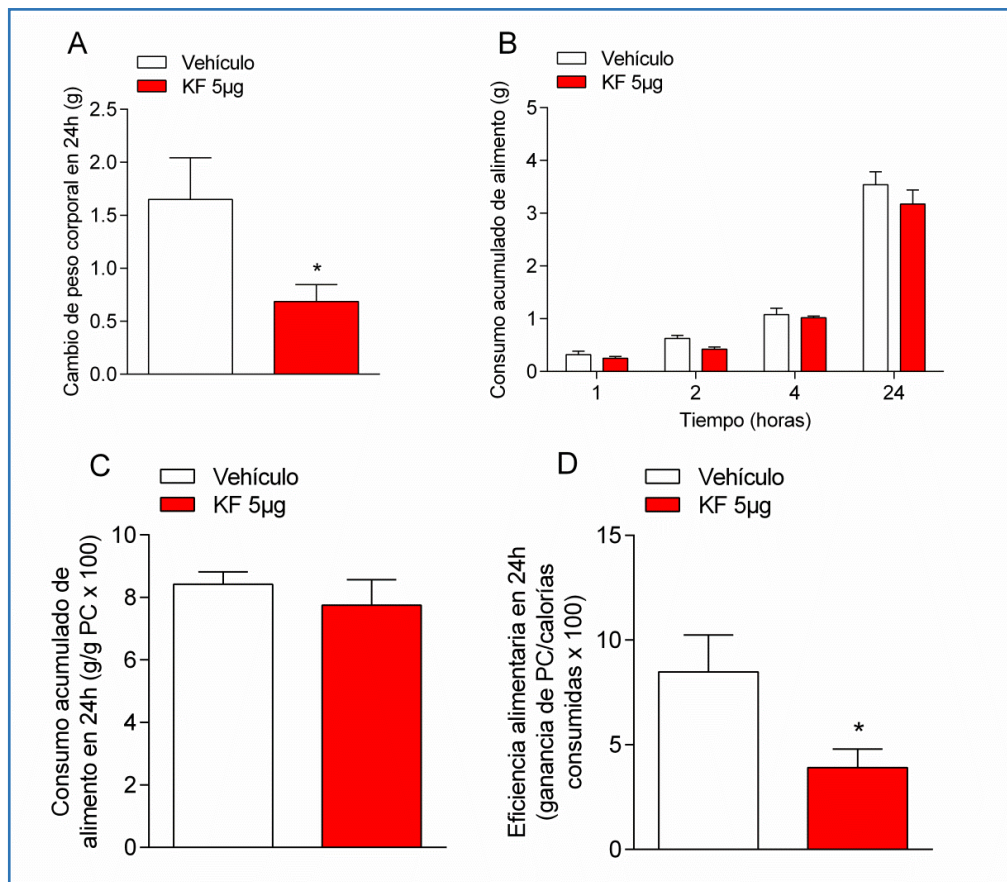


Figura 36. Efecto agudo de la administración i.c.v. de KF sobre el BE en ratones obesos. Se evaluó el efecto de la inyección en el ventrículo lateral de 5 μ g de KF sobre: el cambio de PC (A), CA acumulado (B), CA normalizado al PC (C) y la EA (D). El grupo Vehículo (barras en blanco) recibió 2 μ L de DMSO y el grupo KF (barras en rojo) 5 μ g de KF disueltos en 2 μ L de DMSO. Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías (B) seguido del post-test de Bonferroni y con una prueba t de Student (A, C y D). * $p < 0.05$. $n = 6$ ratones/grupo.

DISCUSIÓN

La obesidad y sobrepeso no solo representan un problema estético, por la acumulación de tejido graso, pues además está relacionada estrechamente con otras condiciones médicas como afecciones cardíacas, hipertensión arterial, problemas respiratorios, problemas gástricos e incluso síndromes de depresión, así como algunos tipos de cáncer (Galicia-Negrete y Falfán-Valencia 2017; Kolb et al. 2016). Otra de las afecciones que van de la mano con la obesidad es el síndrome metabólico, el cual se ha observado en pacientes obesos a través de un desbalance en los niveles plasmáticos de lípidos (triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol), hiperglucemia e insulinoresistencia (Jais y Brüning 2017b). El alto costo social y económico, debido al alto gasto ocasionado a pacientes y al sector salud de los gobiernos, de la obesidad vuelve indispensable investigar para desenmarañar las bases fisiopatológicas implicadas en el desarrollo de esta enfermedad. Los mecanismos del desarrollo de la obesidad no están aun completamente comprendidos, pero algunas líneas de investigación sugieren que el desarrollo de un cuadro de inflamación, en respuesta a un sobre consumo de DHL, pueden inducir un estado de obesidad (Valdearcos et al. 2014). Nuestro equipo de trabajo demostró recientemente el rol causal de la respuesta inflamatoria en el desarrollo de obesidad, ya que bloqueando dicha respuesta, a través de la inhibición de la proliferación de la microglía hipotalámica, se logró bloquear la ganancia de PC de ratones expuestos a una DHL (André et al., 2017).

Los flavonoides son compuestos aromáticos con sustitución de grupos hidroxilos (Veeramuthu et al. 2017). Dentro de este amplio grupo se encuentran la quercetina, rutina, leutonina, KF, entre otros, dichos compuestos son de una abundancia alta en el mundo vegetal. Dichos compuestos han despertado un gran interés gracias a sus propiedades como antioxidantes (Valdearcos et al. 2014). Además, sus propiedades antiinflamatorias también han llamado ampliamente la atención para su estudio en el contexto de la obesidad y enfermedades relacionadas como la DT2 (M. Calderon-Montano et al. 2011; Pietta 2000). El bajo consumo de vegetales y su correspondiente bajo consumo de flavonoles como la quercetina y el KF, asociado al estilo de alimentación moderna, podría explicar el boom de la prevalencia de obesidad y DT2. Sin embargo, pocos estudios han sido realizados para conocer sus efectos reales sobre la obesidad y ninguno se ha hecho para relacionar beneficios metabólicos con actividad sobre la inflamación metabólica. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar si el tratamiento con KF es capaz de: 1) disminuir el estado de obesidad, 2) reducir el estado inflamatorio hipotalámico y 3) actuar sobre el BE a nivel central. Un estudio previo realizado por da-Silva et al., (2007) mostró que el KF es capaz de inducir el GE, *in vitro* usando células musculares mostraron que este compuesto induce la expresión y actividad de la deiodinasa 2 (Dio2), enzima responsable de la activación de la hormona tiroidea por ende un aumento en la termogénesis (da-Silva et al. 2007). Dicho mecanismo es regulado críticamente por el sistema de las melanocortinas (POMC-> α MSH->MC4R) a nivel del hipotálamo (Contreras et al. 2017). En base a lo

mencionado arriba, estudiamos en ratones normo-peso el efecto de la administración i.p. de 0.5 ó 1 mg/kg de KF sobre el balance BE. Los resultados mostraron una tendencia a reducir la ganancia de PC durante 24h de realimentación en el grupo tratado con KF. Dicha tendencia fue asociada con una disminución en la EA a la 24h con la dosis de 0.5 mg/kg. Ningún cambio en los valores del CA fue observado. La disminución de la EA sugiere un aumento de GE probablemente a través de una promoción por el KF de la termogénesis, como observado por da-Silva y colaboradores (2007). El efecto del KF pudo haber sido ejercido a nivel periférico (en músculo) (da-Silva et al. 2007). Sin embargo, un aumento en la termogénesis a nivel del tejido adiposo pardo o blanco, como consecuencia de la acción del KF sobre el hipotálamo, no puede ser excluido, dada su capacidad de modular el sistema de las melanocortinas (Park et al. 2010).

Dado que el KF redujo la EA en 24h y tendió a reducir la ganancia de PC, nosotros hipotetizamos que una administración crónica mejora el estado metabólico de ratones obesos. Cabe señalar que el modelo de obesidad inducida por DHL es un modelo ampliamente usado y validado para este tipo de estudios (Hariri y Thibault 2010). En nuestro caso, los ratones expuestos a la DHL desarrollaron un cuadro de obesidad severa (aumento de PC de 80% con respecto al PC inicial) en el lapso de 12 semanas de exposición. Para probar nuestra hipótesis, la dosis que mostro efecto sobre la EA (0.5 mg/kg repartida en dos inyecciones por día de 0.25 mg/kg) fue administrada durante 40 días a ratones obesos alimentados con una DHL. Una reducción del PC asociada a una disminución de la EA apoyaba nuestra hipótesis. Posteriormente evaluamos que KF pudiera tener un afecto sobre el metabolismo de la glucosa que, como sabemos, en un proceso de obesidad se ve altamente alterado. Para ello se realizaron TTG y TSI. Los datos obtenidos de dichas pruebas mostraron una disminución de la glucemia basal a los 38 días de tratamiento con KF fue observada, así como una tendencia ($p=0.067$) a mejorar la respuesta a la insulina, la cual podría alcanzar significancia de continuar el tratamiento más allá de 40 días, pero no mostró cambio a los 32 días en el TTG. Queda igualmente la incógnita de saber si el TTG hubiese mostrado diferencias si se aplicase hacia el final del tratamiento o después. La necesidad de una cronicidad del tratamiento para ver efectos más marcados es apoyada por las observaciones reportadas por Torres-Villareal y colaboradores (2019), quienes observaron beneficios metabólicos en ratones obesos alimentados con una dieta rica en flavonoides durante 28 semanas (~200 días de tratamiento) (Torres-Villarreal et al. 2019). Nuestros resultados son consistentes con la literatura, en la cual se encuentra que compuestos emparentados con el KF, como la quercetina, pueden tener un beneficio en la obesidad y la regulación de la glucosa en sangre, además, de sus propiedades anti-inflamatorias (Mahat et al. 2010; da-Silva et al. 2007). Para explicar los mecanismos de acción subyacentes a la regulación de la glucemia se han propuesto varias vías de señalización, pero aún no se ha definido un mecanismo, algunos estudios sugieren que pueden estar regulados por las enzimas AMPK Y MAPK. (Ahn et al. 2008; Zhang et al. 2016).

Las dietas ricas en grasa, comúnmente consumidas en el estilo de vida moderno, tienen un impacto negativo sobre el sistema de regulación del BE. Diversos reportes de la literatura han mostrado su efecto inductor sobre la resistencia a la insulina y leptina, que representan un par de mecanismos complejos por los cuales se regula el BE y que son altamente sensibles a los efectos negativos de los ácidos grasos saturados a nivel del ARC (Ando et al., 2008; Enriori et al., 2007). También se ha reportado que dietas ricas en grasas saturadas promueven una respuesta inmune en el hipotálamo, pero esto puede cambiar a lo largo del tiempo de exposición a la dieta como lo reporta Baufeldy colaboradores (2016). Este tema parece ser muy discutido pero concuerdan en la capacidad de las DHLs de activar la respuesta inmune innata del cerebro. Todo esto afecta al balance energético en el hipotálamo, el cual al estar desbalanceado puede llevar a un cuadro de obesidad (Baufeld et al. 2016; Valdearcos et al. 2014; Yi et al. 2012). Dado que esta inflamación central conlleva a un cuadro de obesidad, determinamos evaluar potenciales cambios en los niveles de activación de la microglía en el ARC por efecto del tratamiento crónico con KF. El tratamiento por 40 días llevó a una reducción significativa de los niveles de activación de la microglía. El número absoluto y el porcentaje de células activadas en los animales KF fueron menores al presentado en el grupo Vehículo. Lo que nos sugiere una disminución del estado inflamatorio del mencionado núcleo del hipotálamo. Al no contar con marcadores de citocinas proinflamatorias, esta posibilidad es meramente especulativa. Sin embargo, esta hipótesis es apoyada por reportes en la literatura de estudios *in vitro* sobre la propiedades antiinflamatorias del KF, el cual disminuye la presencia de citocinas (Mahat et al. 2010).

Las observaciones del presente estudio concernientes a los efectos del KF sobre procesos regulados por el hipotálamo como el BE, además de la disminución del estado inflamatorio del ARC, sugieren una acción central del KF. Para tratar de responder esta hipótesis realizamos una estrategia experimental que consistió en la administración i.c.v. de KF y se evaluó su efecto sobre el BE. El tratamiento agudo con KF disminuyó significativamente la ganancia de PC y la EA, sin cambios en el CA acumulado de 24h. Estos resultados muestran la capacidad del KF para modular centralmente el BE, confirman la hipótesis de la implicación de una acción central en los efectos observados cuando es administrado periféricamente (i.p.). La acción del KF a nivel del ARC no puede ser garantizada, ya que el compuesto fue inyectado en el ventrículo lateral. Sin embargo, es muy probable que a ese nivel pueda estar ejerciendo sus efectos, ya que en esta estructura reside el sistema de las melanocortinas y el sistema de la hormona tiroidea cuya función es esencial para la regulación del GE (Contreras et al. 2017). Una manera de esclarecer esta cuestión es analizando la expresión de componentes de dichos sistemas en el ARC luego de una administración aguda de KF. El análisis del nivel de activación de la microglía en otras zonas del cerebro en ratones tratados crónicamente con KF sería de gran utilidad para establecer si los efectos antiinflamatorios son exclusivos del ARC.

CONCLUSIÓN

Los resultados de esta trabajo muestra que el KF es capaz de regular el BE tanto en ratones normo-peso como en ratones obesos. Además, el tratamiento crónico con KF mejora el estado de obesidad de ratones con obesidad inducida por la dieta. Dicho efectos son asociados con una mejora del metabolismo de la glucosa y del estado inflamatorio del ARC, el centro regulador del BE. La reproducción de los efectos observados con la administración periférica cuando el KF es administrado centralmente sugiere que los efectos de este flavonoide son ejercidos, al menos en parte, a nivel central. En este trabajo mostramos por primera vez que KF es capaz de regular el BE a nivel central y la inflamación hipotalámica. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar los mecanismos subyacentes a estos efectos. A partir del resultado global de este trabajo podemos concluir que el uso del KF se presenta como una nueva estrategia terapéutica para el combate de la obesidad y sus enfermedades asociadas, enfocándose en sus efectos hipotalámicos. No obstante, un cuidado especial debe ser tomado para su manejo dado su alta inestabilidad. Un modelo del mecanismo de acción de los efectos del kaempferol es presentado en la **Figura 37**.

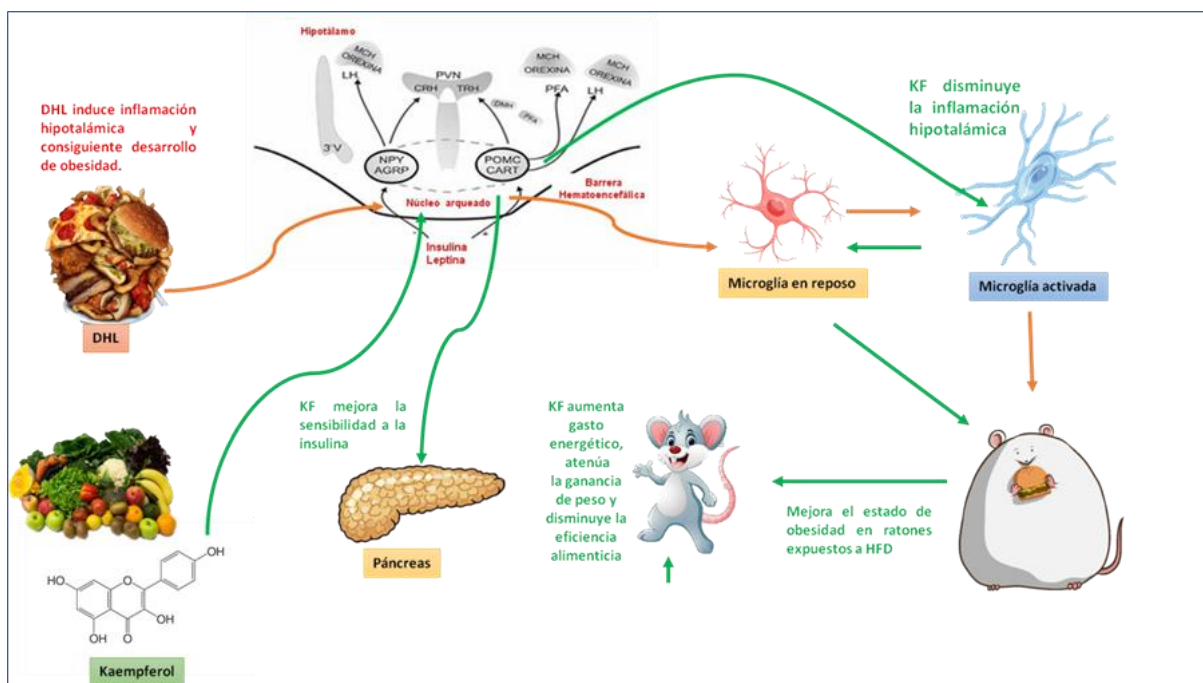


Figura 37. Modelo del mecanismo de acción del KF para inducir sus beneficios metabólicos. El KF proveniente de los alimentos actúa a nivel del ARC para reduciendo el nivel de activación de la microglía inducida por el consumo de DHL. La reducción de la inflamación restablece la sensibilidad a la insulina y homeostasis de la glucosa, así como los procesos de termogénesis, restableciendo a su vez la correcta regulación del BE.

PERSPECTIVAS

Del presente trabajo se desprenden varias preguntas cuyas respuestas consolidarían el entendimiento de los mecanismos de acción del KF. Primero, sería importante medir los niveles plasmáticos de indicadores metabólicos (triglicéridos, colesterol, insulina, etc.), de marcadores de toxicidad (enzimas hepáticas, creatinina, etc.) y marcadores inflamatorios periféricos (IL-1 β). Esto ayudaría a una mejor comprensión de los efectos del KF y ayudarían a excluir un peligro de su uso por razones de toxicidad. Segundo, un análisis de expresión de marcadores proinflamatorios a nivel del hipotálamo luego de una administración i.c.v. con KF. Tercero, analizar los niveles de activación de la microglía en otras áreas para mostrar que los efectos de KF son tejido-específicos (ARC). Cuarto, mostrar que el KF es capaz de alcanzar el ARC, administrándolo i.p. y sacrificando en un determinado tiempo para analizar por cromatografía la presencia del KF en el ARC.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, Ahmad, y Palaniyandi Ramanan. 2018. "Kaempferol Mitigates Endoplasmic Reticulum Stress Induced Cell Death by Targeting Caspase 3/7". *Scientific Reports* 8(1):2189.
- Ahn, Jiyun, Hyunjung Lee, Suna Kim, Jaeho Park, y Taeyoul Ha. 2008. "The Anti-Obesity Effect of Quercetin Is Mediated by the AMPK and MAPK Signaling Pathways". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373(4):545–49.
- Ambrósio, Gabriela, Fernanda N. Kaufmann, Luana Manosso, Nicolle Platt, Gabriele Ghisleni, Ana Lúcia S. Rodrigues, Débora K. Rieger, y Manuella P. Kaster. 2018. "Depression and Peripheral Inflammatory Profile of Patients with Obesity". *Psychoneuroendocrinology* 91:132–41.
- Ando, Hitoshi, Seiji Nakamura, Seiichiro Kurita, Hirofumi Misu, Tsuguhito Ota, Masayoshi Yokoyama, Masao Honda, Ken-ichi Miyamoto, y Shuichi Kaneko. 2008. "Increased Oxidative Stress Precedes the Onset of High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity". *Metabolism* 57(8):1071–77.
- André, Caroline, Omar Guzman-Quevedo, Charlotte Rey, Julie Rémus-Borel, Samantha Clark, Ashley Castellanos-Jankiewicz, Elodie Ladeveze, Thierry Leste-Lasserre, Agnes Nadjar, Djoher Nora Abrous, Sophie Laye, y Daniela Cota. 2017. "Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation". *Diabetes* 66(4):908–19.
- Baltasar, Aniceto. 2001. *Obesidad y cirugía: cómo dejar de ser obeso*. Arán Ediciones.
- Baufeld, Caroline, Anja Osterloh, Stefan Prokop, Kelly R. Miller, y Frank L. Heppner. 2016. "High-Fat Diet-Induced Brain Region-Specific Phenotypic Spectrum of CNS Resident Microglia". *Acta Neuropathologica* 132(3):361–75.
- Bray, G. A., K. K. Kim, y J. P. H. Wilding. 2017. "Obesity: A Chronic Relapsing Progressive Disease Process. A Position Statement of the World Obesity Federation". *Obesity Reviews* 18(7):715–23.
- Carbone, Salvatore, Carl J. Lavie, y Ross Arena. 2017. "Obesity and Heart Failure: Focus on the Obesity Paradox". *Mayo Clinic Proceedings* 92(2):266–79.
- Carneiro, Isabella P., Sarah A. Elliott, Mario Siervo, Raj Padwal, Simona Bertoli, Alberto Battezzati, y Carla M. Prado. 2016. "Is Obesity Associated with Altered Energy Expenditure?" *Advances in Nutrition* 7(3):476–87.
- Caron, Alexandre, y Denis Richard. 2017. "Neuronal Systems and Circuits Involved in the Control of Food Intake and Adaptive Thermogenesis". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1391(1):35–53.
- Cerri, Matteo. 2017. "The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications". *Annual Review of Physiology* 79(1):167–86.
- Cirilo, Beatriz. 2012. "Aspectos epidemiológicos de la obesidad en América Latina: los desafíos a futuro". *Medwave* 12(01).
- Cnop, Miriam, Fabienne Fougère, y Licio A. Velloso. 2012. "Endoplasmic Reticulum Stress, Obesity and Diabetes". *Trends in Molecular Medicine* 18(1):59–68.
- Contreras, Cristina, Rubén Nogueiras, Carlos Diéguez, Kamal Rahmouni, y Miguel López. 2017. "Traveling from the Hypothalamus to the Adipose Tissue: The Thermogenic Pathway". *Redox Biology* 12:854–63.
- Cysneiros Grazielle Fonseca. 2019. "The addition of cactus flour (*Opuntia ficus indica*) to the Western-style diet attenuates the onset of metabolic disorders in rats" editado por Gonzalez Judith Libertad Chavez. *Nutrition & Food Science* 49(4):564–79.

- Dalvi, P. S., J. A. Chalmers, V. Luo, D. Yd Han, L. Wellhauser, Y. Liu, D. Q. Tran, J. Castel, S. Luquet, M. B. Wheeler, y D. D. Belsham. 2017. "High Fat Induces Acute and Chronic Inflammation in the Hypothalamus: Effect of High-Fat Diet, Palmitate and TNF- α on Appetite-Regulating NPY Neurons". *International Journal of Obesity* 41(1):149–58.
- Dandona, P. 2004. "Inflammation: The Link between Insulin Resistance, Obesity and Diabetes". *Trends in Immunology* 25(1):4–7.
- De Jonghe, Bart C., Matthew R. Hayes, y Kendra K. Bence. 2011. "Melanocortin Control of Energy Balance: Evidence from Rodent Models". *Cellular and Molecular Life Sciences* 68(15):2569–88.
- De Souza, Cláudio T., Eliana P. Araujo, Silvana Bordin, Rika Ashimine, Ricardo L. Zollner, Antonio C. Boschero, Mário J. A. Saad, y Lício A. Velloso. 2005. "Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus". *Endocrinology* 146(10):4192–99.
- Derghal, Adel, Mehdi Djelloul, Jérôme Trouslard, y Lourdes Mounien. 2017. "The Role of MicroRNA in the Modulation of the Melanocortinergic System". *Frontiers in Neuroscience* 11.
- Devi, Kasi Pandima, Dicson Sheeja Malar, Seyed Fazel Nabavi, Antoni Sureda, Jianbo Xiao, Seyed Mohammad Nabavi, y Maria Daglia. 2015. "Kaempferol and Inflammation: From Chemistry to Medicine". *Pharmacological Research* 99:1–10.
- Diz-Chaves, Yolanda, Olga Pernía, Paloma Carrero, y Luis M. Garcia-Segura. 2012. "Prenatal Stress Causes Alterations in the Morphology of Microglia and the Inflammatory Response of the Hippocampus of Adult Female Mice". *Journal of Neuroinflammation* 9(1):580.
- Dorfman, Mauricio D., y Joshua P. Thaler. 2015. "Hypothalamic Inflammation and Gliosis in Obesity": *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* 22(5):325–30.
- Douglass, John D., Mauricio D. Dorfman, y Joshua P. Thaler. 2017. "Glia: Silent Partners in Energy Homeostasis and Obesity Pathogenesis". *Diabetologia* 60(2):226–36.
- Dragano, Nathalia R. V., Carina Solon, Albina F. Ramalho, Rodrigo F. de Moura, Daniela S. Razolli, Elisabeth Christiansen, Carlos Azevedo, Trond Ulven, y Licio A. Velloso. 2017. "Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation". *Journal of Neuroinflammation* 14(1):91.
- Enriori, Pablo J., Anne E. Evans, Puspha Sinnayah, Erin E. Jobst, Luciana Tonelli-Lemos, Sonja K. Billes, Maria M. Glavas, Bernadette E. Grayson, Mario Perello, Eduardo A. Nillni, Kevin L. Grove, y Michael A. Cowley. 2007. "Diet-Induced Obesity Causes Severe but Reversible Leptin Resistance in Arcuate Melanocortin Neurons". *Cell Metabolism* 5(3):181–94.
- Farias, Gisele, Bárbara Dal Molin Netto, Solange Cravo Bettini, Ana Raimunda Dâmaso, y Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas. 2017. "Neuroendocrine Regulation of Energy Balance: Implications on the Development and Surgical Treatment of Obesity". *Nutrition and Health* 23(3):131–46.
- Fontenelle, L. C., M. M. Feitosa, J. S. Severo, T. E. C. Freitas, J. B. S. Morais, F. L. Torres-Leal, G. S. Henriques, y D. do Nascimento Marreiro. 2016. "Thyroid Function in Human Obesity: Underlying Mechanisms". *Hormone and Metabolic Research* 48(12):787–94.
- Galicía-Negrete, Gustavo, y Ramcés Falfán-Valencia. 2017. "Mediadores de la respuesta inflamatoria en asma y su relación con obesidad". *Revista Alergia México* 64(2):198–205.
- Galleano, Monica, Valeria Calabro, Paula D. Prince, María C. Litterio, Barbara Piotrkowski, Marcela A. Vazquez-Prieto, Roberto M. Miatello, Patricia I. Oteiza, y Cesar G. Fraga.

2012. "Flavonoids and Metabolic Syndrome: Flavonoids and Metabolic Syndrome". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1259(1):87–94.
- Gómez-Zorita, Saioa, Arrate Lasa, Naiara Abendaño, Alfredo Fernández-Quintela, Andrea Mosqueda-Solís, Maria Pilar Garcia-Sobreviela, Jose M. Arbonés-Mainar, y Maria P. Portillo. 2017. "Phenolic compounds apigenin, hesperidin and kaempferol reduce in vitro lipid accumulation in human adipocytes". *Journal of Translational Medicine* 15(1):237.
- Guruvaiah, Ponmari, Huimin Guo, Daxiang Li, y Zhongwen Xie. 2018. "Preventive Effect of Flavonol Derivatives Abundant Sanglan Tea on Long-Term High-Fat-Diet-Induced Obesity Complications in C57BL/6 Mice". *Nutrients* 10(9).
- Hall, Kevin D., y Juen Guo. 2017. "Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet Composition". *Gastroenterology* 152(7):1718-1727.e3.
- Hariri, Niloofar, y Louise Thibault. 2010. "High-Fat Diet-Induced Obesity in Animal Models". *Nutrition Research Reviews* 23(2):270–99.
- Harpaz, Eynav, Snait Tamir, Ayelet Weinstein, y Yitzhak Weinstein. 2016. "The effect of caffeine on energy balance". *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 28(1):1–10.
- Hartz, A. 1983. "Relationship of Obesity to Diabetes: Influence of Obesity Level and Body Fat Distribution". *Preventive Medicine* 12(2):351–57.
- Hopkins, M., y J. E. Blundell. 2016. "Energy Balance, Body Composition, Sedentariness and Appetite Regulation: Pathways to Obesity". *Clinical Science* 130(18):1615–28.
- Jais, Alexander, y Jens C. Brüning. 2017a. "Hypothalamic Inflammation in Obesity and Metabolic Disease". *The Journal of Clinical Investigation* 127(1):24–32.
- Jais, Alexander, y Jens C. Brüning. 2017b. "Hypothalamic Inflammation in Obesity and Metabolic Disease". *Journal of Clinical Investigation* 127(1):24–32.
- Kawarazaki, Wakako, y Toshiro Fujita. 2016. "The Role of Aldosterone in Obesity-Related Hypertension". *American Journal of Hypertension* 29(4):415–23.
- Kazak, Lawrence, Edward T. Chouchani, Gina Z. Lu, Mark P. Jedrychowski, Curtis J. Bare, Amir I. Mina, Manju Kumari, Song Zhang, Ivan Vuckovic, Dina Laznik-Bogoslavski, Petras Dzeja, Alexander S. Banks, Evan D. Rosen, y Bruce M. Spiegelman. 2017. "Genetic Depletion of Adipocyte Creatine Metabolism Inhibits Diet-Induced Thermogenesis and Drives Obesity". *Cell Metabolism* 26(4):660-671.e3.
- Keihani, Sorena, Farhad Hosseinpanah, Maryam Barzin, Sara Serahati, Soraya Doustmohamadian, y Fereidoun Azizi. 2015. "Abdominal Obesity Phenotypes and Risk of Cardiovascular Disease in a Decade of Follow-up: The Tehran Lipid and Glucose Study". *Atherosclerosis* 238(2):256–63.
- Kim, Jung D., Stephanie Leyva, y Sabrina Diano. 2014. "Hormonal Regulation of the Hypothalamic Melanocortin System". *Frontiers in Physiology* 5.
- Kolb, Ryan, Fayyaz S. Sutterwala, y Weizhou Zhang. 2016. "Obesity and cancer: inflammation bridges the two". *Current opinion in pharmacology* 29:77–89.
- Kong, Lingxi, Cheng Luo, Xiuying Li, Yuanda Zhou, y Haixia He. 2013a. "The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits". *Lipids in Health and Disease* 12(1):115.
- Kong, Lingxi, Cheng Luo, Xiuying Li, Yuanda Zhou, y Haixia He. 2013b. "The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits". *Lipids in Health and Disease* 12(1):115.
- Koosha, Sanaz, Mohammed A. Alshawsh, Chung Yeng Looi, Atefehalsadat Seyedan, y Zahurin Mohamed. 2016. "An Association Map on the Effect of Flavonoids on the Signaling Pathways in Colorectal Cancer". *International Journal of Medical Sciences* 13(5):374–85.

- Kwon, Yoon-Hee, Jiye Kim, Chu-Sook Kim, Thai Hien Tu, Min-Seon Kim, Kyoungcho Suk, Dong Hee Kim, Byung Ju Lee, Hye-Seon Choi, Taesun Park, Myung-Sook Choi, Tsuyoshi Goto, Teruo Kawada, Tae Youl Ha, y Rina Yu. 2017. "Hypothalamic Lipid-Laden Astrocytes Induce Microglia Migration and Activation". *FEBS Letters* 591(12):1742–51.
- Lee, Jong-Jer, Pei-Wen Wang, I. Hui Yang, Hsiu-Mei Huang, Chia-Shiang Chang, Chia-Lin Wu, y Jiin-Haur Chuang. 2015. "High-Fat Diet Induces Toll-Like Receptor 4-Dependent Macrophage/Microglial Cell Activation and Retinal Impairment". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(5):3041–50.
- M. Calderon-Montano, J., E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero, y M. Lopez-Lazaro. 2011. "A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol". *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11(4):298–344.
- Mahat, Mahamad Yunnus A., Nagaraj M. Kulkarni, Santosh L. Vishwakarma, Farhin R. Khan, B. S. Thippeswamy, Vijay Hebballi, Anjana A. Adhyapak, Vijay S. Benade, Saudagar Mohammad Ashfaq, Suraj Tubachi, y Basangouda M. Patil. 2010. "Modulation of the Cyclooxygenase Pathway via Inhibition of Nitric Oxide Production Contributes to the Anti-Inflammatory Activity of Kaempferol". *European Journal of Pharmacology* 642(1–3):169–76.
- McAninch, Elizabeth A., y Antonio C. Bianco. 2014. "Thyroid Hormone Signaling in Energy Homeostasis and Energy Metabolism". *Annals of the New York Academy of Sciences* 1311(1):77–87.
- Miean, Koo Hui, y Suhaila Mohamed. 2001. "Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6):3106–12.
- Mierziak, Justyna, Kamil Kostyn, y Anna Kulma. 2014. "Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment". *Molecules* 19(10):16240–65.
- Muhammad, Dima, Jane Hubert, Nathalie Lalun, Jean-Hugues Renault, Hélène Bobichon, Mohammed Nour, y Laurence Voutquenne-Nazabadioko. 2015. "Isolation of Flavonoids and Triterpenoids from the Fruits of *Alphitonia Neocaledonica* and Evaluation of Their Anti-Oxidant, Anti-Tyrosinase and Cytotoxic Activities: Phytochemical Analysis of *Alphitonia Neocaledonica* Fruits". *Phytochemical Analysis* 26(2):137–44.
- Ozcan, Lale, Ayse Seda Ergin, Allen Lu, Jason Chung, Sumit Sarkar, Duyu Nie, Martin G. Myers, y Umut Ozcan. 2009. "Endoplasmic Reticulum Stress Plays a Central Role in Development of Leptin Resistance". *Cell Metabolism* 9(1):35–51.
- Park, Soo-Hyun, Yun-Beom Sim, Pyung-Lim Han, Jin-Koo Lee, y Hong-Won Suh. 2010. "Antidepressant-like Effect of Kaempferol and Quercetin, Isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*". *Experimental Neurobiology* 19(1):30–38.
- Pietta, Pier-Giorgio. 2000. "Flavonoids as Antioxidants". *Journal of Natural Products* 63(7):1035–42.
- Reeves, Philip G., H. Nielsen, y C. Fahey. s/f. "AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet". 14.
- Schaeffer, Marie, David J. Hodson, y Patrice Mollard. 2014. "The Blood-Brain Barrier as a Regulator of the Gut-Brain Axis". Pp. 29–49 en *Frontiers of Hormone Research*. Vol. 42, editado por P. J. D. Delhanty y A. J. van der Lely. Basel: S. KARGER AG.
- da-Silva, Wagner S., John W. Harney, Brian W. Kim, Jing Li, Suzy D. C. Bianco, Alessandra Crescenzi, Marcelo A. Christoffolete, Stephen A. Huang, y Antonio C. Bianco. 2007. "The Small Polyphenolic Molecule Kaempferol Increases Cellular Energy Expenditure and Thyroid Hormone Activation". *Diabetes* 56(3):767–76.

- Steppan, Claire M., Shannon T. Bailey, Savitha Bhat, Elizabeth J. Brown, Ronadip R. Banerjee, Christopher M. Wright, Hiralben R. Patel, Rexford S. Ahima, y Mitchell A. Lazar. 2001. "The Hormone Resistin Links Obesity to Diabetes". *Nature* 409(6818):307–12.
- Subramaniam, Sudhakar R., y Howard J. Federoff. 2017. "Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease". *Frontiers in Aging Neuroscience* 9:176.
- Thaler, Joshua P., Chun-Xia Yi, Ellen A. Schur, Stephan J. Guyenet, Bang H. Hwang, Marcelo O. Dietrich, Xiaolin Zhao, David A. Sarruf, Vitaly Izgur, Kenneth R. Maravilla, Hong T. Nguyen, Jonathan D. Fischer, Miles E. Matsen, Brent E. Wisse, Gregory J. Morton, Tamas L. Horvath, Denis G. Baskin, Matthias H. Tschöp, y Michael W. Schwartz. 2012. "Obesity Is Associated with Hypothalamic Injury in Rodents and Humans". *The Journal of Clinical Investigation* 122(1):153–62.
- Torres-Villarreal, D., A. Camacho, H. Castro, R. Ortiz-Lopez, y A. L. de la Garza. 2019. "Anti-Obesity Effects of Kaempferol by Inhibiting Adipogenesis and Increasing Lipolysis in 3T3-L1 Cells". *Journal of Physiology and Biochemistry* 75(1):83–88.
- Valdearcos, Martin, Megan M. Robblee, Daniel I. Benjamin, Daniel K. Nomura, Allison W. Xu, y Suneil K. Koliwad. 2014. "Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function". *Cell Reports* 9(6):2124–38.
- Veeramuthu, Duraipandian, William Raja Tharsius Raja, Naif Abdullah Al-Dhabi, y Ignacimuthu Savarimuthu. 2017. "Flavonoids: Anticancer Properties". *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*.
- Waterson, Michael J., y Tamas L. Horvath. 2015. "Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding". *Cell Metabolism* 22(6):962–70.
- Westerterp, K. R. 2017. "Control of Energy Expenditure in Humans". *European Journal of Clinical Nutrition* 71(3):340–44.
- Wilkinson, Michael, y S. Ali Imran. 2018. *Clinical Neuroendocrinology: An Introduction*. 1a ed. Cambridge University Press.
- Wilson, Jenny L., y Pablo J. Enriori. 2015. "A Talk between Fat Tissue, Gut, Pancreas and Brain to Control Body Weight". *Molecular and Cellular Endocrinology* 418:108–19.
- Yi, C. X., M. H. Tschop, S. C. Woods, y S. M. Hofmann. 2012. "High-Fat-Diet Exposure Induces IgG Accumulation in Hypothalamic Microglia". *Disease Models & Mechanisms* 5(5):686–90.
- Yu, Yi-Hao. 2017. "Making Sense of Metabolic Obesity and Hedonic Obesity: 代谢型肥胖症和嗜食型肥胖症". *Journal of Diabetes* 9(7):656–66.
- Zang, Yanqing, Liping Zhang, Kiharu Igarashi, y Changqing Yu. 2015. "The Anti-Obesity and Anti-Diabetic Effects of Kaempferol Glycosides from Unripe Soybean Leaves in High-Fat-Diet Mice". *Food & Function* 6(3):834–41.
- Zhang, Xianan, Qiang Lv, Sheng Jia, Yanhong Chen, Chongde Sun, Xian Li, y Kunsong Chen. 2016. "Effects of Flavonoid-Rich Chinese Bayberry (*Morella Rubra* Sieb. et Zucc.) Fruit Extract on Regulating Glucose and Lipid Metabolism in Diabetic KK-A^y Mice". *Food & Function* 7(7):3130–40.
- Zhuang, Zhengling, Guangqun Ye, y Bin Huang. 2017. "Kaempferol Alleviates the Interleukin-1 β -Induced Inflammation in Rat Osteoarthritis Chondrocytes via Suppression of NF- κ B". *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 23:3925–31.

ANEXOS

Anexo 1

ESTUDIO DE LOS EFECTOS PROMOVIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DEL FLAVONOIDE KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATÓN. **12º Congreso Estatal de Ciencias, Tecnología e Innovación y 6º Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán.** 05 y 06 de octubre de 2017, Morelia, Michoacán. **Presentación en cartel.**

5 y 6 octubre 2017
Quinto de Ciencias Exactas y Experimentales de Morelia

Congreso Estatal de Ciencias
Tecnología e Innovación
6º Encuentro de Jóvenes Investigadores

El Gobierno del Estado de Michoacán de Ocampo, a través de la Secretaría de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico otorgan la presente:

CONSTANCIA

A. Blanca V. Carrillo Tello, Pedro A. Romero Juárez

Por su ponencia en la "Mesa 5.- Ciencias Médicas, Biomedicina y Salud", titulada: **ESTUDIO DE LOS EFECTOS PROMOVIDOS POR LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DEL FLAVONOIDE KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO EN RATÓN**

En el marco de las actividades académicas del 12º Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el Sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán.

Morelia, Michoacán a 6 de octubre de 2017.


Dr. José Luis Montañez Espinosa
Secretario de Innovación, Ciencia y Desarrollo Tecnológico.

MÉXICO
CONACYT
MICHOACÁN
Estado en el

Anexo 2

ESTUDIO DE LOS BENEFICIOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DEL FLAVONOIDE KAEMPFEROL EN RATONES OBESOS. **1^{er} Seminario Internacional de Desórdenes Metabólicos de la carrera en Industrias Alimentarias: Rol de la nutrición en el desarrollo y tratamiento de la obesidad y la diabetes.** 07 de septiembre de 2018, Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro, Tacámbaro, Michoacán. **Presentación oral**

	Certificado de Participación	Certificate of Participation
Otorgado a / Given to : <u>Pedro Alberto Romero Juárez</u>		
Por su ponencia en el 1^{er} Seminario Internacional de Desórdenes Metabólicos de la carrera en Industrias Alimentarias: Rol de la nutrición en el desarrollo y tratamiento de la obesidad y la diabetes	For having attended as a speaker the 1st International Seminar on Metabolic Disorders of the Food Industries program: Role of nutrition in the development and treatment of obesity and diabetes	
7 de septiembre de 2018	September the 7th, 2018	
Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro Tacámbaro, Michoacán, México		
 Ing. José Antonio Guzmán Cuevas Jefe de división de la carrera "Industrias Alimentarias" Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro	 M.V.Z. Juan Manuel Ponce Pérez Subdirector de la institución Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro	
 SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA	 TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TACÁMBARO	 MICHOCÁN

ESTABLECIENDO EL ROL DEL HIPOTÁLAMO EN LOS EFECTOS ANTIPOBESIGÉNICOS DEL KAEMPFEROL. **14° Congreso Estatal de Ciencias, Tecnología e Innovación y 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán.** 29 y 30 de octubre de 2019, Morelia, Michoacán. **Presentación oral.**

60

Anexo 4

Pedro A. Romero Juárez, Luis Miguel Saavedra Pimentel, Diego Bulcão Visco, Ana Elisa Toscano, RaulManhães de Castro, Luz Torner & Omar Guzmán Quevedo. Estableciendo el rol del hipotálamo en los efectos antiobesigénicos del kaempferol. **Publicación in extenso** en el marco del 14° Congreso Estatal de Ciencias, Tecnología e Innovación y 8° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Morelia, Michoacán, 2019.



ESTABLECIENDO EL ROL DEL HIPOTÁLAMO EN LOS EFECTOS ANTI OBESIGÉNICOS DEL KAEMPFEROL

Pedro A. Romero Juárez¹, Luis Miguel Saavedra Pimentel², Diego Bulcão Visco³, Ana Elisa Toscano⁴, Raul Manhães de Castro⁵, Luz Torner⁶, Omar Guzmán Quevedo⁷.

Resumen

La obesidad es el principal problema de salud pública en el mundo debido a su estrecha relación con enfermedades como la diabetes de tipo 2, dislipidemia, etc. La obesidad surge de una desregulación hipotalámica del balance energético (BE), es decir, el hipotálamo pierde la capacidad de mantener un equilibrio entre el consumo y gasto de calorías. El consumo excesivo de comida chatarra, ricas en grasas saturadas y azúcares refinados, lleva a un proceso de inflamación hipotalámica como estado inicial de la pérdida de la regulación del BE y consiguiente desarrollo de obesidad. Por otro lado, el kaempferol, un flavonoide presente en vegetales, es conocido por regular el BE e inflamación. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar si el kaempferol es capaz de regular el BE y la inflamación hipotalámica en ratón obesos. La administración intracerebroventricular aguda de kaempferol redujo el consumo de alimento, la ganancia de peso y la eficiencia alimentaria. El tratamiento crónico intraperitoneal redujo peso corporal y eficiencia alimenticia. Interesantemente, datos preliminares mostraron que las mejoras metabólicas son asociadas a una reducción del estado inflamatorio en el hipotálamo. Este trabajo muestra por primera vez la asociación del hipotálamo con los beneficios metabólicos del kaempferol. Así, el uso del kaempferol surge como una estrategia para tratar la obesidad a través de la corrección de las alteraciones hipotalámicas.

Palabras claves

Obesidad, BE, Hipotálamo, Inflamación hipotalámica, Kaempferol.

Introducción

La obesidad resulta de una ruptura del equilibrio energético del organismo, conocido como BE, es decir el consumo de calorías supera a las calorías gastadas. Dicho equilibrio energético es regulado por el cerebro, a través de una participación crítica del hipotálamo. En el núcleo arqueado del hipotálamo, se detecta el nivel de energía del organismo interpretando señales hormonales y nutrientes a través del sistema de las melanocortinas, induciendo respuestas de apetito o anorexia dependiendo del estado (Arble et al. 2013). El mecanismo encargado de mantener la homeostasis

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; pedroromerojuarez@gmail.com
² Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; imsp@_003@hotmail.com
³ Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; diegovisco@gmail.com
⁴ Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; aeltoscano@yahoo.com.br
⁵ Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; raulmanhaesdecastro@gmail.com
⁶ Centro de Investigaciones Biomédicas del IMSS Michoacán (CIBIMI); luz_torner@yahoo.com
⁷ Laboratorio de NeuroNutrición y Desórdenes Metabólicos, Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro; omar.guzman-quevedo@estacambaro.edu.mx





energética consta de dos poblaciones neuronales antagónicas entre sí, las neuronas que expresan neuropeptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP), de tipo orexigénicas, y su contraparte las neuronas de proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado a cocaína y anfetamina (CART), de tipo anorexigénicas (Thaler et al., 2012). Este fino balance puede ser alterado por un consumo excesivo de grasas saturadas, que forman parte de la alimentación moderna, incluso pueden llevar a una activación de células microgliales, las cuales son células inmunológicas del cerebro, provocando una inflamación y consecuente al desarrollo de obesidad (André et al., 2017).

Se ha observado que bloqueando la activación microglial, se protege del desarrollo de obesidad inducido por dieta hiperlipídica en animales de experimentación. Por otro lado, el kaempferol (KF), un compuesto de tipo flavonoide presente en gran cantidad de frutas y vegetales, es reconocido como regulador del metabolismo energético y antiinflamatorio (da Silva et al., 2007). En este sentido, el objetivo global de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento crónico con KF sobre el BE en ratones obesos.

Antecedentes

Estudios previos de nuestro equipo de trabajo mostraron que la inflamación en el hipotálamo, el centro de regulación del BE, inducida por consumo de dieta hipercalórica, juega un rol central en el desarrollo de obesidad (André et al., 2017). Datos de la literatura muestran la capacidad del KF para: reducir la inflamación (Kadioglu et al., 2015), inducir el gasto energético (da Silva et al., 2007) y aumentar la expresión de POMC en el hipotálamo (Park et al., 2010). Así, en este trabajo se investigó si el KF es capaz de modular el BE a través de efectos centrales.

Objetivos

1. Evaluar si la administración crónica de KF vía intraperitoneal (i.p.) modula el balance energético.
2. Determinar si la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de KF ejerce efecto sobre el BE.

Materiales y Métodos

Todos los experimentos se realizaron en ratones de la cepa C57Bl/6J, los cuales se adquirieron del Instituto de Neurobiología de la UNAM (Juriquilla, Querétaro, México), los cuales fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12h y a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, con acceso a alimentos y agua *ad libitum* (a menos que se indique lo contrario). Toda manipulación se llevó a cabo siguiendo las pautas de los reglamentos nacionales (NOM-062-ZOO-1999) e internacionales (Institutos Nacionales de Salud) para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Para inducir la obesidad, durante 12 semanas los ratones consumieron una dieta hiperlipídica (60% de calorías provenientes de la grasa). Para el objetivo 1, los animales fueron inyectados vía i.p. a una dosis de 0.25 mg/kg, dos veces por día, por 40 días y el consumo de alimento y el peso corporal fue monitoreado para determinar el consumo total de alimento y el cambio de peso en ese periodo. Para el objetivo 2, después de las 12 semanas de inducción de obesidad, los ratones fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg, i.p.)



y xilazina (10 mg/kg, i.p.) y una canula se les implanto en las siguientes coordenadas del bregma (antero-posterior -0.5 mm; medio-lateral -1.2 mm y dorso-ventral -2.1 mm). Después de dos semanas de recuperación los animales obesos fueron puestos en ayuno por 24h y una dosis de 5µg por ratón de KF fueron administrados vía i.c.v. y el consumo de alimento fue monitoreado a los siguientes tiempos: 1, 2, 4 y 24h después de la inyección. El cambio de peso en 24 horas fue determinado y la eficiencia alimentaria fue calculada. Los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism Versión 6.00 (La Jolla, California, EUA).

Resultados

La administración i.p. de KF durante 40 días llevó a una disminución de peso corporal (Fig. 1A). El tratamiento, sin embargo, no afectó el consumo de alimento durante los 40 días (Fig. 1B y 1C). Al disminuir el peso corporal sin cambios en el consumo de alimento llevó a una reducción de la eficiencia alimentaria (Fig. 1D). Estos datos muestran que la inyección crónica i.p. de KF es capaz de modular el BE, reduciendo la capacidad de transformar las calorías consumidas en peso corporal.

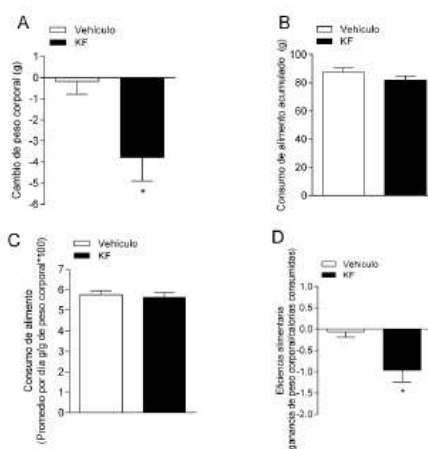


Figura 1. Evaluación del tratamiento crónico con KF en ratones obesos. 0.25 mg/kg de KF fueron administrados vía i.p. por 40 días y el cambio de peso corporal (A), el consumo de alimento (B y C) y la eficiencia alimentaria (D) fueron determinados. Datos analizados por t de Students. * $p < 0.05$. $n = 7$ por grupo.



Debido a que el BE es regulado críticamente en el hipotálamo, la modulación del BE mostrada por el resultado obtenido del tratamiento i.p. sugiere que el KF puede actuar centralmente. Para probar esta hipótesis se analizaron los efectos de la administración i.c.v. de KF sobre el BE. La administración de KF en ratones obesos redujo la ganancia de peso corporal, 24 horas después de la inyección (Fig. 2A). La misma inyección tendió a reducir el consumo de alimento, 2 horas después del reto (Fig. 2B) y disminuyó la eficiencia alimentaria (Fig. 2C). Los datos obtenidos de la administración i.c.v. de KF indican que este compuesto flavonoide es capaz de actuar a nivel cerebral para modular el BE.

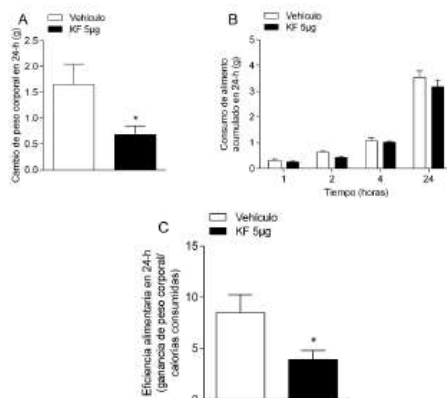


Figura 2. Evaluación del tratamiento agudo con KF en ratones obesos. 5 µg de KF fueron administrados vía i.c.v. y el cambio de peso corporal (A), el consumo de alimento en 24-h (B) y la eficiencia alimentaria en 24-h (C) fueron determinados. Datos analizados por ANOVA de una vía o t de Students. * $p < 0.05$. $n = 7$ por grupo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos de este trabajo muestran por primera vez la capacidad del kaempferol de regular centralmente el BE, promoviendo mejoras en ratones obesos. Además, datos preliminares (no mostrados) sugieren que el tratamiento crónico vía i.p. es capaz de reducir el estado inflamatorio del hipotálamo. Así, el uso adecuado de este flavonoide, altamente sensible al calor, podría ser una estrategia terapéutica para el combate de la obesidad y enfermedades relacionadas a través de sus efectos regulatorios a nivel central.

Referencias bibliográficas

- André C, Guzman-Quevedo O, Rey C, Rémus-Borel J, Clark S, Castellanos-Jankiewicz A, Ladeveze E, Leste-Lasserre T, Nadjar A, Abrous DN, Laye S & Cota D. (2017). Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. *Diabetes*. Apr;66(4):908-919.
- Arble DM & Sandoval DA. (2013). CNS control of glucose metabolism: response to environmental challenges. *Front Neurosci*. Feb 26;7:20.
- Kadioglu O, Nass J, Saeed ME, Schuler B & Efferth T. (2015). Kaempferol Is an Anti-Inflammatory Compound with Activity towards NF- κ B Pathway Proteins. *Anticancer Res*. May;35(5):2645-50.
- Organizador Mundial de la Salud. (2016). Día Mundial de la Salud 2016: diabetes. Sitio web: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2016/event/es/>.
- Park SH, Sim YB, Han PL, Lee JK & Suh HW. (2010). Antidepressant-like Effect of Kaempferol and Quercitrin, Isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Exp Neurobiol*. Jun; 19(1): 30-38.
- da-Silva WS, Hamey JW, Kim BW, Li J, Bianco SD, Crescenzi A, Christoffolete MA, Huang SA & Bianco AC. (2007). The Small Polyphenolic Molecule Kaempferol Increases Cellular Energy Expenditure and Thyroid Hormone Activation. *Diabetes*. Mar;56(3):767-76.
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH & Schwartz MW. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. Jan;122(1):153-62.
- Vinayagam R. & Xu B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: A cellular mechanism review. *Nutr Metab (Lond)*. Dec 23;12:60.

Anexo 5

Romero-Juárez P, Urquiza-Martínez M, Visco D, Medina-Navarro R, Mercado-Camargo R, Toscano A, Manhães-de-Castro R, Torner L, Cota D & Guzmán-Quevedo O. Kaempferol induces metabolic benefits by regulating the energy balance and hypothalamic inflammation. **Artículo original en preparación** para someter a la revista *Journal of Neuroinflammation o Nutrients*.

Evidencia:

Fig. 1. Romero-Juárez et al.

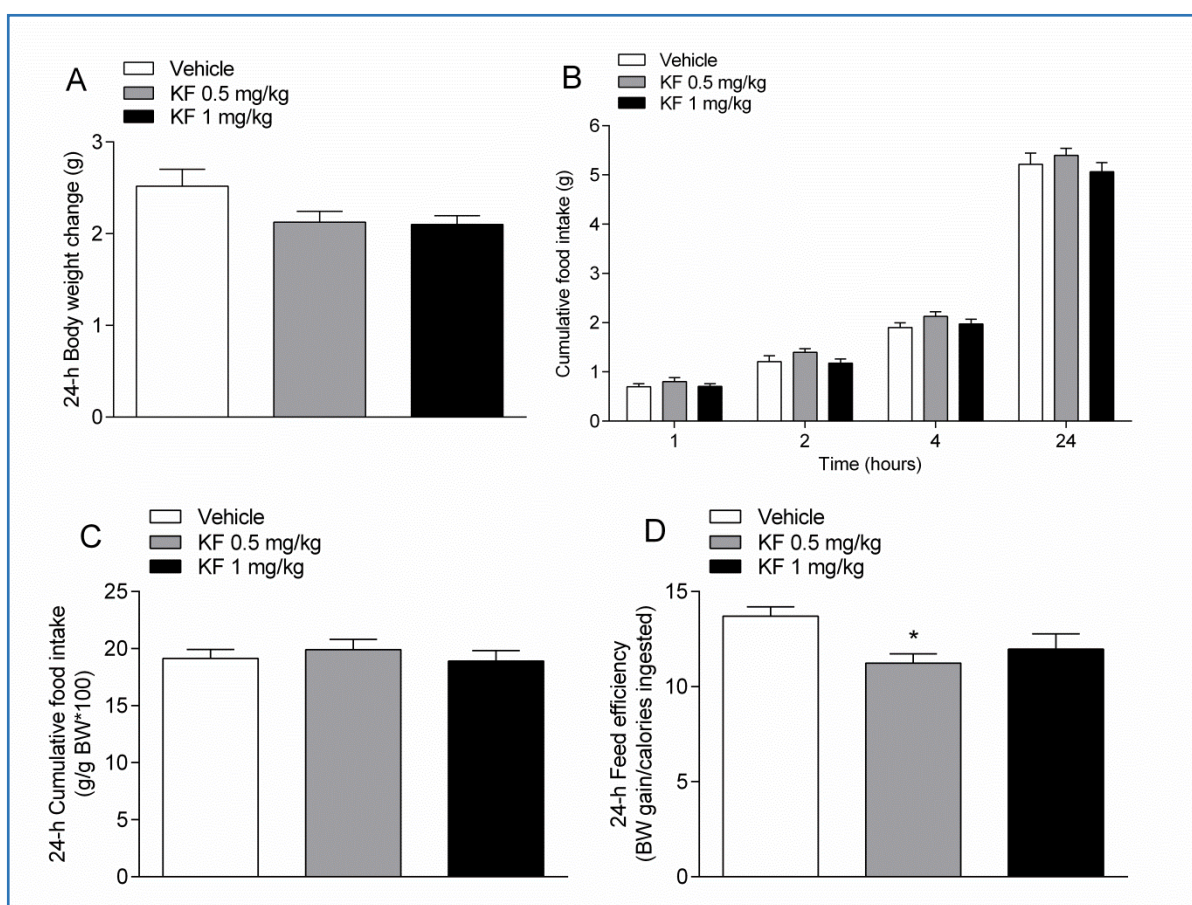


Fig. 2. Romero-Juárez et al.

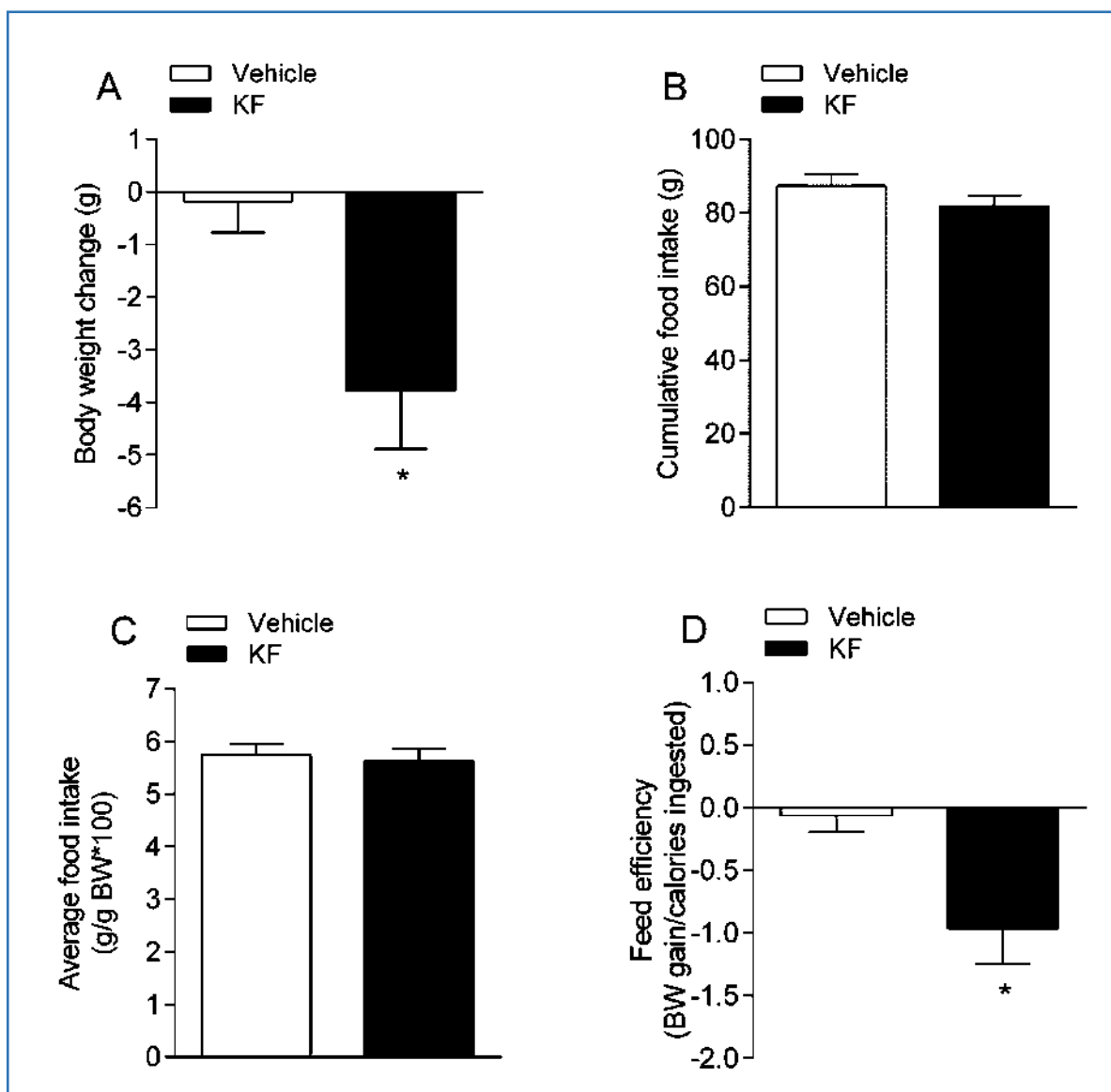


Fig. 3. Romero-Juárez et al.

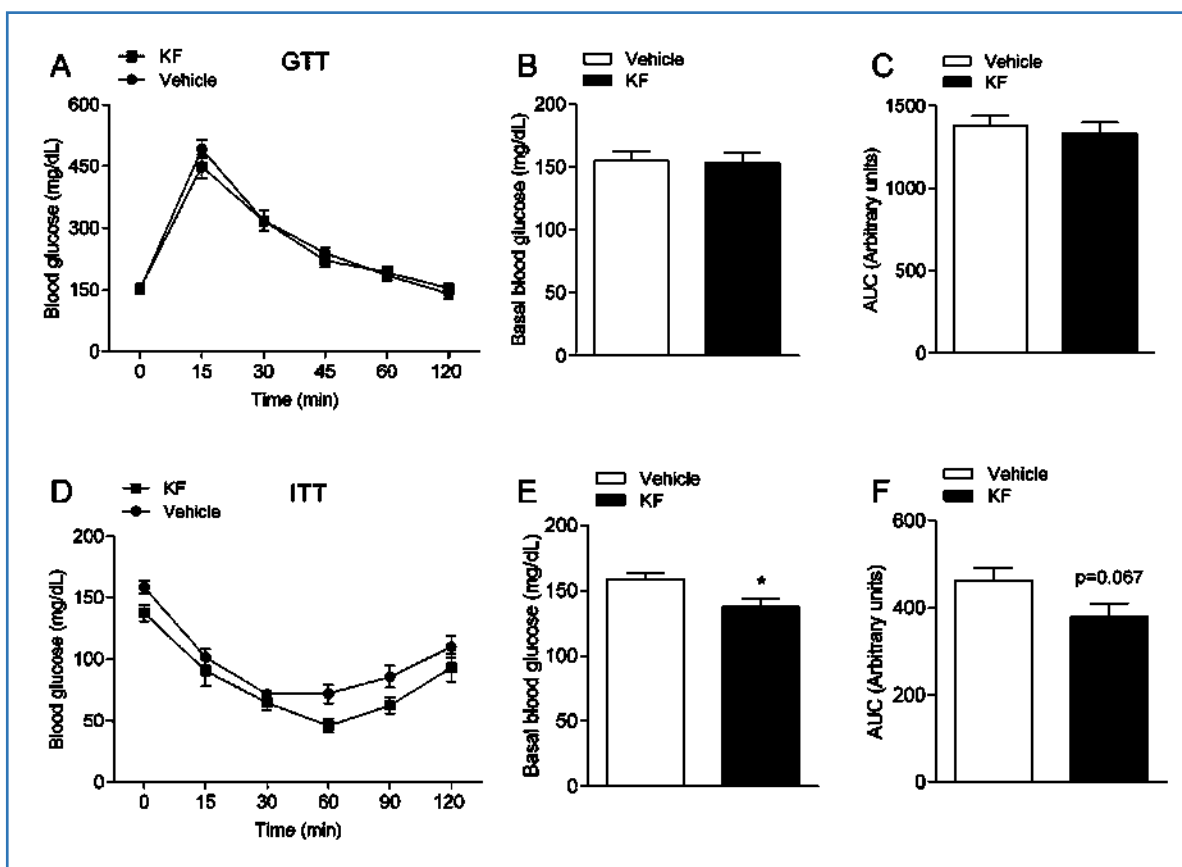


Fig. 4. Romero-Juárez et al.

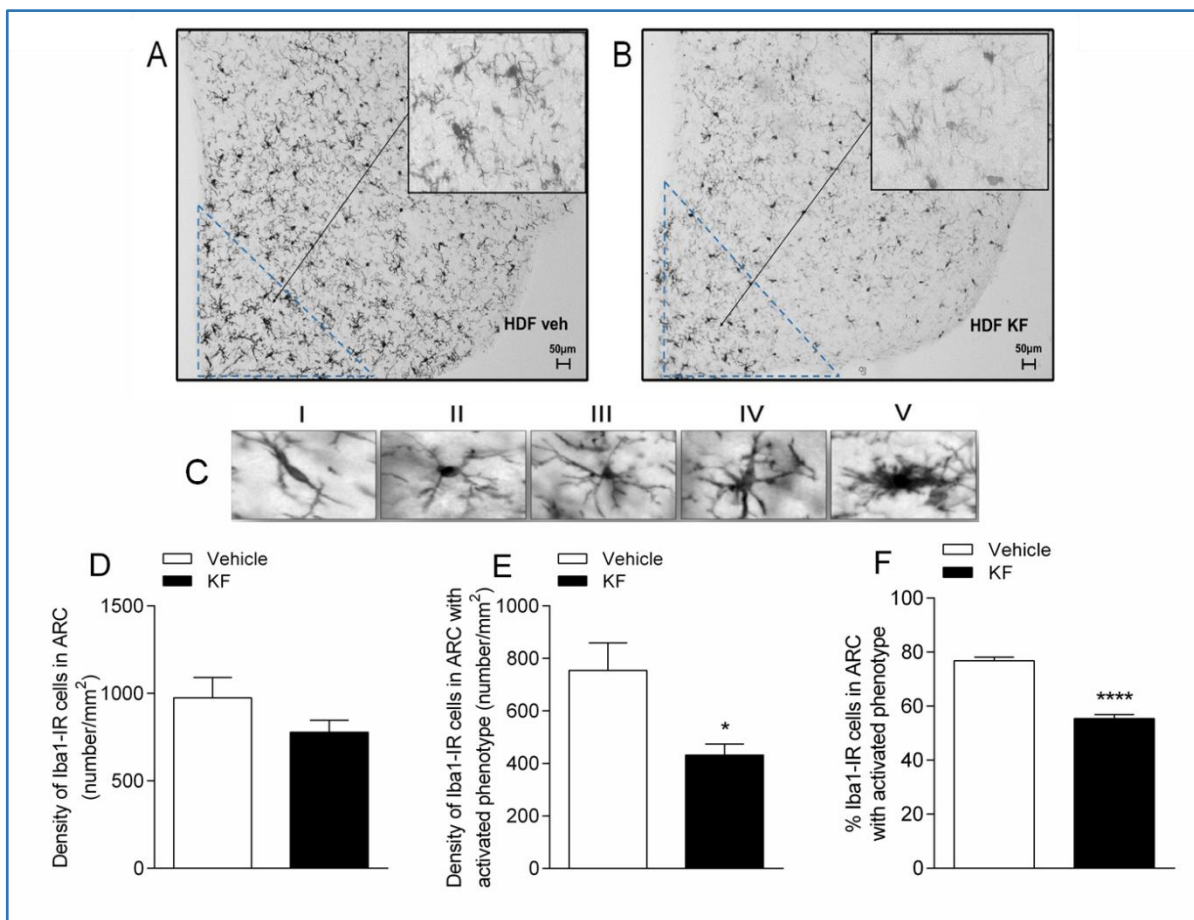


Fig. 5. Romero-Juárez et al.

