



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Biol. Exp. LUIS EDUARDO VALDERRÁBANO FAJARDO

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE RECEPTORES A TIROTROPINA (TSHR)
EN TEJIDO ADIPOSO PERIAÓRTICO Y SU PAPEL SOBRE LA VASCULATURA EN
UN MODELO MURINO DE OBESIDAD”

Directores

- Dr. Julio César Almanza Pérez.
- Dr. Jaime Héctor Gómez Zamudio.

Asesor:

- Dr. Fausto Sánchez Muñoz.

México D.F.

Noviembre 2017

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT:
426063

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: **“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE RECEPTORES A TIROTROPINA (TSHR) EN TEJIDO ADIPOSO PERIAÓRTICO Y SU PAPEL SOBRE LA VASCULATURA EN UN MODELO MURINO DE OBESIDAD”**, que presentó:

LUIS EDUARDO VALDERRÁBANO FAJARDO

El día 28 de Noviembre del año 2017.

Sinodales:

○ **Dr. Gerardo Blancas Flores.**

Profesor – Investigador. Depto. Ciencias de la Salud. UAM – Iztapalapa.
gera@xanum.uam.mx.

Presidente

○ **Dr. Samuel Enoch Estrada Soto.**

Profesor – Investigador. Facultad de Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. enoch@uaem.mx

Secretario

○ **Dr. Adán Valladares Salgado.**

Investigador Asociado C. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, UMAE Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” Centro Médico Nacional “Siglo XXI”. Instituto Mexicano del Seguro Social. adanval@gmail.com

Vocal

○ **Dra. Martha Lázaro Suárez.**

Postdoctorante UAM. Depto. Ciencias de la Salud. UAM – Iztapalapa.
marthalazaros8@gmail.com

Vocal

COMITÉ TUTORAL

Co-Director Interno:

- **Dr. Julio C. Almanza Pérez.** Profesor-Investigador Titular C Depto. Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. jcap@xanum.uam.mx. Tel. (55) 58046483.

Co-Director Externo:

- **Dr. Jaime H. Gómez Zamudio.** Investigador Asociado E1. Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, UMAE Hospital de Especialidades “Bernardo Sepúlveda Gutiérrez” Centro Médico Nacional “Siglo XXI”. Instituto Mexicano del Seguro Social. jaime_gomez_zamudio@hotmail.com. Tel. 5627-6900 ext. 21780.

Asesor:

- **Dr. Fausto Sánchez Muñoz.** Investigador en Ciencias Médicas Nivel D. Departamento de Inmunología. Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. fausto22@yahoo.com. Tel. 5573 2911.

*A la memoria de Zenaido Fajardo Quintanar, mi abuelo.
Por regalarnos 103 años de enseñanza, historias y alegría.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Elisa e Israel, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo a través de todo este tiempo.

A mi hermano, Abraham, por ser el ejemplo de un hermano mayor y del cual aprendí aciertos y de momentos difíciles; por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, y por la motivación constante.

A mi novia, Adriana, por entenderme en todo, porque en todo momento fue un apoyo incondicional en mi vida. Te agradezco por tantas ayudas y tantos aportes no solo para el desarrollo de mi tesis, sino también para mi vida; eres mi inspiración y mi motivación.

A mis asesores, Dr. Jaime, Dr. Julio y Dr. Fausto, por su gran apoyo y motivación para la culminación de este postgrado y para la elaboración de esta tesis; por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de mi formación profesional.

A mis amigos, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos: Ramón, Iñaky, Choby, Gibrán, Soraya, Carlos, Sandra, Rafa, Rebe, Nacho, Gloria y Vanessa.

Por último, a todos los que han formado parte de este trabajo, a mis compañeros, a la universidad y a la Unidad de Investigación en Bioquímica por todo el apoyo brindado.

RESUMEN

La obesidad se considera un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV), las cuales representan una de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Los mecanismos involucrados en el desarrollo de estas complicaciones no son del todo claros, y se ha propuesto que la presencia de un estado inflamatorio podría contribuir de manera importante al desarrollo de estas comorbilidades. Se ha propuesto que la tirotropina (TSH), la cual se encuentra aumentada en pacientes obesos, puede estar participando en el desarrollo de inflamación, debido a su capacidad de producir citocinas proinflamatorias mediante la activación de su receptor TSHR sobre el tejido adiposo visceral. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si este receptor se encuentra presente en el tejido adiposo perivascular (PVAT), el cual participa de manera importante en la modulación de la vasculatura. Por lo que el presente trabajo se enfocó en determinar la presencia del TSHR en el PVAT, su participación en la producción de citocinas proinflamatorias y su posible modulación del tono vascular que pudieran contribuir a los cambios vasculares que se observan en la obesidad.

Se utilizaron ratas Sprague Dawley de 2 meses de edad divididas en tres grupos los cuales estuvieron durante 15 semanas con las siguientes dietas: grupo control, grupo CAF (dieta de cafetería) y el grupo fructosa (fructosa 10%). Se evaluaron cambios en el peso corporal, parámetros bioquímicos, las concentraciones séricas de TSH, así como la expresión de su receptor en el PVAT de los diferentes grupos. Se incubaron explantes de PVAT y aorta con TSH para determinar su efecto sobre la producción TNF α (factor de necrosis tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6). Además, se realizaron experimentos funcionales en la aorta para evaluar el efecto de TSH sobre el PVAT en la modulación del tono vascular.

En los resultados obtenidos se determinó que la dieta de cafetería fue el mejor modelo para generar obesidad con respecto al grupo de fructosa. No observamos diferencias significativas en los niveles de TSH séricos ni en los parámetros bioquímicos entre en los grupos evaluados. El TSHR se encuentra mayormente expresado en el tejido adiposo blanco, pero también se expresa de manera abundante en PVAT y en la aorta. No hubo diferencias en la expresión de TSHR en el PVAT entre los grupos control y CAF. Por el contrario, la expresión de este receptor disminuyó significativamente en la aorta del grupo CAF. Al estimular explantes de PVAT y aorta con TSH observamos un aumento significativo en la concentración de TNF α e IL-6 a las 6 horas de incubación. Sin embargo, la producción de ambas citocinas fue significativamente menor en el grupo CAF. Por último, la incubación de anillos aórticos con TSH (10 mUI/mL) provocó una disminución en las curvas concentración-respuesta a fenilefrina únicamente en los anillos con PVAT. Además, TSH (10 mUI/mL) fue capaz de producir contracción directamente en los anillos aórticos, y la presencia tanto de PVAT como de endotelio regulan la contracción producida por TSH.

En conclusión, el TSHR se encuentra expresado en el PVAT, y su activación aumenta la síntesis de citocinas proinflamatorias en PVAT y aorta. Sin embargo, los resultados funcionales, sugieren que su activación en PVAT y el endotelio está más relacionada con un aumento en la producción de factores relajantes que modulan la contracción; mientras que, por el contrario, en el musculo liso de la aorta su activación puede producir contracción directamente.

ABSTRACT

Obesity has become a risk problem for the development of several diseases, such as type 2 diabetes (DM2), cardiovascular diseases (CVD), insulin resistance, and hypertension, among others. Obesity is characterized as an abnormal or excessive accumulation of fat, particularly in adipose tissue. Recently, it has been proposed that thyrotropin (TSH), which is increased in obese patients, could be participating in the development of inflammation. TSH produces proinflammatory cytokines by activating their TSHR receptor on visceral adipose tissue. However, it is unknown whether this receptor is present in perivascular adipose tissue (PVAT), which plays an important role in the modulation of the vasculature. The present work was focused on determining the presence of TSHR in PVAT, its participation in the production of proinflammatory cytokines, and its possible modulation of vascular tone.

Sprague Dawley rats aged initially 2 months old were housed in three groups: control group, CAF diet, and fructose group for 15 weeks. Changes in body weight, biochemical parameters, and serum TSH concentrations were evaluated. The expression of TSHR, TNF α , IL-6, IL-1 β , leptin, adiponectin, and MCP-1 in PVAT was determined by PCR. PVAT and aorta explants were incubated with TSH to determine their effect on the production of TNF α and IL-6 (interleukin 6). In addition, functional experiments in the aorta were performed to evaluate the effect of TSH on PVAT in the modulation of vascular tone.

The CAF diet was an effective model to generate obesity. There was no change in serum TSH levels and biochemical parameters. The presence of TSHR was more abundant in white adipose tissue, but it was also identified in aorta and PVAT. No differences were observed in the TSHR expression between control and CAF groups. On the contrary, the expression of TSHR was decreased in aorta of the CAF group. The stimulation of PVAT and aorta explants from the control group with TSH promotes a significant increase of TNF and IL-6 production at 6 hrs of incubation. However, the production of both cytokines was reduced in the CAF group. Finally, the aortic rings incubated with TSHR (10 mUI/mL) caused a decrease in the concentration-response curves to Phenylephrine only in presence of PVAT. In addition, TSH (10mUI/ml) produced a direct contraction in aortic rings without PVAT in control animals, this contraction was inhibited by the presence of PVAT an endothelium.

In conclusion, TSHR is expressed in PVAT, and its activation is able to increase the synthesis of proinflammatory cytokines in PVAT and aorta. However, functional results suggest that the activation in PVAT and the endothelium is more related to an increase in the production of relaxing factors that modulate contraction; whilst, on the other hand, in the smooth muscle of the aorta, its activation can produce contraction directly.

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
1.1. Obesidad.....	1
1.2. Tirotropina (TSH) y Obesidad.....	3
1.3. Tejido Adiposo.....	6
1.3.1. Tipos de Tejido Adiposo.....	6
1.3.2. Tejido Adiposo Marrón (BAT).	7
1.3.3. Tejido Adiposo Beige (BeAT)	7
1.3.4. Tejido Adiposo Blanco.....	8
1.4. Tejido Adiposo y la Inflamación.....	9
1.5. Estructura de los Vasos Sanguíneos.	12
1.5.1. Túnica Íntima.....	13
1.5.2. Túnica Media.....	14
1.5.3. Túnica Adventicia.....	14
1.6. Tejido Adiposo Perivascular (PVAT)	14
1.6.1. PVAT y la vasculatura.....	16
2. Antecedentes.....	19
3. Justificación.....	22
4. Hipótesis.....	23
5. Objetivos del Proyecto.....	24
6. Material y Método.....	25
6.1. Animales de Experimentación.....	25
6.2. Dieta de Cafetería (CAF)	25
6.3. Disección.....	26
6.4. Concentraciones de TSH por medio de ELISA.....	27
6.5. Extracción de RNA.....	28
6.6. PCR – Tiempo Real.....	29
6.7. Concentraciones de Citocinas.....	30
6.8. Experimentos del Tono Vascular.....	31
6.9. Análisis Estadístico.....	32
7. Resultados.....	33
8. Discusión.....	46
9. Conclusiones.....	55
10. Anexos.....	56
11. Bibliografía.....	60

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Obesidad

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un exceso de grasa corporal. De acuerdo con la OMS, el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2017) y se caracteriza por tener un índice de masa corporal superior a 30, el cual se obtiene a partir de un modelo matemático que correlaciona positivamente con el contenido de grasa corporal (Arterburn and Noël 2001).

El índice de masa corporal (IMC) es un indicador simple de la relación entre el peso y la talla que se utiliza frecuentemente para identificar el sobrepeso y la obesidad en los adultos. Se calcula dividiendo el peso de una persona en kilos por el cuadrado de su talla en metros (kg/m^2). En el caso de los adultos, la OMS define el sobrepeso y la obesidad como se indica a continuación: sobrepeso; IMC igual o superior a 25 y obesidad; IMC igual o superior a 30 (OMS,2017).

La obesidad se ha convertido en uno de los problemas más importantes de salud pública en todo el mundo y se considera un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DM2), enfermedades cardiovasculares (ECV), resistencia a la insulina, hipertensión, entre otros. En el caso de México, la obesidad y el sobrepeso afectan al 34.4% de los adolescentes entre los 12 y 19, lo que representa alrededor de 6 325 131 individuos con esta enfermedad. En el caso de adultos mayores de 20 años se observa una prevalencia combinada de sobrepeso y obesidad del 72.5%. Para el 2016 se presentó un aumento de 1.3% con respecto a la última encuesta realizada

en el 2012. Esta información sugiere que la población adulta tiene mayor riesgo de presentar enfermedades asociadas con este padecimiento (ENSANUT, 2016).

La obesidad es una enfermedad en la cual intervienen muchos factores, donde interactúa tanto la genética como el medio ambiente. Actualmente, la vida cotidiana ha sufrido diferentes cambios en la forma de alimentación como son el aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos altos en grasas y azúcares, además de una reducción en la actividad física diaria; esto ha tenido como consecuencia que el sobrepeso y la obesidad sean un problema cada vez más común en la población mundial (OMS, 2016).

A nivel celular, la obesidad puede considerarse como una enfermedad hipertrófica resultado de un aumento en el número o tamaño de los adipocitos individuales. Nuevas células de grasa vienen de una población preexistente de progenitor no diferenciado con gran capacidad de proliferación y diferenciación (Lu et al. 2012). Una característica importante de la obesidad es el incremento en los niveles plasmáticos de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, las cuales pueden generar inflamación de bajo grado y la activación del sistema inmune. Estas citocinas son secretadas principalmente por el tejido adiposo. El aumento en los niveles de citocinas proinflamatorias como pueden ser interleucina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) ahora son considerados como marcadores de riesgo para diferentes enfermedades como puede ser diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, las personas con sobrepeso junto con una acumulación del tejido adiposo corren un mayor riesgo de desarrollar estas enfermedades (Teixeira et al. 2017).

Además de los factores mencionados anteriormente, la obesidad se ha relacionado con cambios a nivel hormonal. Particularmente, se ha descrito una relación muy estrecha entre la función tiroidea y las modificaciones en el peso corporal. En estudios de pacientes con hipotiroidismo se ha demostrado que estos pacientes tienen una ganancia de peso mayor en comparación con pacientes eutiroideos. Recientemente, se ha descrito que pacientes con obesidad extrema o mórbida tienen una alta prevalencia de hipotiroidismo subclínico (Gómez-Zamudio et al. 2017). En el hipotiroidismo subclínico, se ha relacionado con alteraciones en el gasto energético teniendo como consecuencia el desarrollo de obesidad, ya que se ha observado que al normalizarse los niveles de TSH, se presenta también una disminución en el peso corporal de estos pacientes (Dahl et al. 2017).

1.2. Tirotropina y Obesidad

Si bien la prevalencia de la obesidad ha aumentado en todo el mundo, la comprensión de su patogénesis y sus consecuencias metabólicas aún son ambiguas. La fisiopatología de la obesidad es muy compleja e involucra diferentes factores, como pueden ser genéticos, ambientales, conductuales, y/o hormonales, que influyen en el desarrollo de la enfermedad (Haslam and James 2005; Michalaki et al. 2006). Al respecto se ha descrito que las hormonas tiroideas pueden participar de manera importante en la fisiopatología de la obesidad, debido a que modulan procesos metabólicos involucrados en la ingesta de alimentos (apetito) y en el control del gasto de energía en reposo (Pearce 2012).

Desde hace varios años se ha descrito la relación entre la función tiroidea y el peso corporal. Si bien es bien sabido que el hipertiroidismo está relacionado con una disminución en el peso corporal, por el contrario, el hipotiroidismo se ha relacionado con una ganancia de peso corporal (Reinehr, 2010). También se ha descrito que las hormonas tiroideas regulan positivamente muchas vías metabólicas relevantes, por lo tanto, no es sorprendente que los pacientes con enfermedades tiroideas usualmente presenten cambios en el peso corporal, la termogénesis y la lipólisis en el tejido adiposo. El aumento en el peso corporal se ha asociado generalmente con el hipotiroidismo debido a disminución de la termogénesis y un metabolismo más lento que pueden llevar al desarrollo de obesidad (Reinehr, 2010).

La obesidad y las funciones tiroideas a menudo se correlacionan. Por ejemplo, en pacientes con obesidad se observa un aumento en los niveles séricos de TSH sin detectarse cambios en los niveles de las hormonas tiroideas T4 y T3, lo que se le conoce como hipotiroidismo subclínico. Además, la reducción del peso corporal en estos pacientes puede normalizar los valores de TSH (Pearce 2012; Rai et al. 2013; Reinehr 2010). Aunque los mecanismos por los cuales los niveles de T3 y T4 se mantienen normales a pesar de estar elevada la TSH se desconocen, se ha encontrado que los niveles de TSH también se encuentran aumentados en el síndrome metabólico, el cual se asocia con resistencia a la insulina debido al defecto en la transducción de la señal posterior al receptor en el tejido diana; un mecanismo similar de resistencia al receptor tiroideo podría estar operando en estas personas obesas. De acuerdo con estos antecedentes se ha sugerido que la TSH puede estar participando en el desarrollo de obesidad. Sin embargo, los resultados al respecto son controversiales ya que no en todos los casos se ha podido asociar la génesis de la obesidad con los niveles de TSH (Tian et al. 2014a). Por lo que todavía no está claro

si las alteraciones en las hormonas tiroideas son una causa o un efecto de la obesidad, lo que se ha sugerido una evaluación a gran escala con la inclusión de diversas hormonas secretadas por el tejido adiposo (leptina, resistina, adiponectina, etc) (Gutch et al. 2017).

La TSH ejerce sus efectos mediante la activación de su receptor (TSHR), el cual es un receptor transmembranal que pertenece a una subfamilia de receptores acoplados a proteínas G heptahelicoidales. En la tiroides, el TSHR juega un papel crítico en la función y desarrollo de la tiroides, participando en la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (Zhang et al. 2009). Sin embargo, estudios recientes han demostrado la presencia del TSHR en tejidos no tiroideos, tales como hepatocitos (Zhang et al. 2009), adipocitos (Haraguchi et al. 1996) y células endoteliales (Tian et al. 2014).

Se ha observado que la activación de TSHR en adipocitos puede jugar un papel importante para en el desarrollo de obesidad (Haraguchi et al. 1996; Zhang et al. 2006). Debido a que se ha encontrado que personas con $IMC > 25$ muestran un aumento en los niveles de expresión de TSHR respecto a personas con $IMC < 25$ (Lu et al. 2012). Además, Lu et al. (2012) sugieren que la expresión desregulada del TSHR podría estar implicada en un aumento en la adipogénesis. Sin embargo, existen otros reportes que muestran una correlación negativa de la adipogénesis con la expresión del TSHR (Bell et al. 2000).

1.3. Tejido Adiposo

El tejido adiposo es un tejido conjuntivo especializado en el almacenamiento de lípidos, el cual está presente en todos los mamíferos. Se puede considerar como un tejido conectivo un tanto atípico puesto que posee muy poca matriz extracelular. Su capacidad para almacenar lípidos se basa en células capaces de contener en su citoplasma grandes gotas de grasa. A este tipo celular se le denomina adipocito. La grasa funciona como un excelente almacén de energía puesto que tiene aproximadamente el doble de densidad calórica que los azúcares o las proteínas. Los adipocitos se agrupan estrechamente y en gran número para formar el tejido adiposo, aunque también se pueden encontrar dispersos en el tejido conectivo laxo (Reinehr 2010). Además, el tejido adiposo se ha contemplado como un órgano de interés en los estudios de la obesidad y los trastornos metabólicos asociados a la dieta.

1.3.1. Tipos de Tejido Adiposo

Se han identificado tres tipos diferentes de adipocitos con diferentes características: blanco (WAT), marrón (BAT) y beige (BeAT). Los adipocitos blancos son los más abundantes, son grandes y almacenan grandes gotas de lípidos llenos de triglicéridos localizándose principalmente en el tejido adiposo subcutáneo (SAT, que corresponde aproximadamente al 85% de la grasa total) y el tejido adiposo visceral (VAT). Los adipocitos blancos actúan como almacén de energía y como un órgano endocrino que puede producir y liberar adipocinas como leptina, adiponectina, IL-6, TNF α o proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1) (Gaggini, Carli, and Gastaldelli 2017).

1.3.2. Tejido Adiposo Marrón

Los depósitos de BAT se reconocen fácilmente por su color debido a la presencia de gran cantidad de mitocondrias. El tamaño de estos adipocitos es significativamente más pequeño que los blancos, y en los roedores este tejido se encuentra entre los omóplatos. La ubicación en los humanos es similar a los roedores, principalmente alrededor del cuello, pero es reconocible sólo cuando se estimula, por ejemplo, por exposición al frío. La principal característica de este tejido es la presencia abundante de mitocondrias y la expresión de la proteína termogenina (UCP-1), que genera calor mediante termogénesis no temblorosa; es decir, la generación de calor por oxidación de grasa, pero con baja producción de ATP. Además, el BAT está altamente innervado por el sistema nervioso simpático, que desencadena la activación de estos adipocitos. Se ha sugerido que la activación del BAT podría contribuir al metabolismo lipídico al aumentar la oxidación de grasas y el gasto de energía a través de la producción de calor. Sin embargo, la contribución de BAT al gasto de energía total en humanos es leve, considerando el tamaño de este depósito (Gaggini, Carli, and Gastaldelli 2017).

1.3.3. Tejido Adiposo Beige

Los adipocitos beige (también conocidos como adipocitos marrones inducibles) en roedores se encuentran dentro de los depósitos de tejido adiposo blanco subcutáneo y perirrenal. En humanos, se han encontrado esparcidos dentro del tejido adiposo blanco. Los adipocitos beige son funcionalmente muy similares a los marrones y pueden surgir en depósitos de WAT específicos en respuesta a diversos estímulos, como pueden ser la exposición al frío y las catecolaminas. Dentro de la grasa epicárdica se descubrieron BeAT, donde podrían proteger al

corazón del frío, pero también son capaces de producir ATP. El origen de estos adipocitos es desconocido, pero probablemente se derivan de la diferenciación de los preadipocitos (Gaggini, Carli, and Gastaldelli 2017).

1.3.4. Tejido Adiposo Blanco

El tejido adiposo blanco es el más abundante del organismo humano adulto y por lo tanto el mayor reservorio energético. Debido a su amplia distribución, es un excelente aislante térmico y desempeña un papel relevante en la conservación de la temperatura corporal considerándose como el principal sistema amortiguador del balance energético. Debido a su capacidad para secretar varias sustancias llamadas adipocinas de forma general, se ha revolucionado el concepto de su función biológica, consolidándose la idea de que no es sólo un órgano que almacena y moviliza energía, sino que es un tejido dinámico y regulador central del metabolismo (Manzur 2010).

Una de las principales funciones de los adipocitos es almacenar y liberar lípidos, por lo que la obesidad es la respuesta al exceso de ingesta calórica. La obesidad está en parte determinada por la capacidad de los adipocitos para cambiar su tamaño dando como resultado un aumento en el peso. Debido a esta respuesta el WAT puede expandirse para almacenar el exceso de ácidos grasos en triglicéridos (lipogénesis), o disminuir su tamaño cuando los lípidos almacenados se hidrolizan (lipólisis) bajo condiciones de ayuno o ejercicio (Gaggini, Carli, and Gastaldelli 2017).

El WAT puede expandirse a través del aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) o el aumento en el número de adipocitos (hiperplasia). Este aumento está correlacionado con un incremento de resistencia a la insulina y se ha formulado la hipótesis de que WAT se vuelve

disfuncional cuando no puede expandirse en respuesta al exceso de ingesta calórica, promoviendo así el almacenamiento del exceso de lípidos en grasa visceral y promoviendo un estado proinflamatorio (Gaggini, Carli, and Gastaldelli 2017).

1.4. Tejido Adiposo y la inflamación

Los adipocitos tradicionalmente eran considerados como células de almacenamiento de energía que jugaban un papel clave en el balance de energía, la termogénesis y la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, los adipocitos también producen una serie de factores solubles (adipocinas) que regulan diferentes procesos relacionados con la inflamación. Estas adipocinas como resistina y leptina, ejercen efectos predominantemente proinflamatorios, mientras que la adiponectina es antiinflamatoria. Por lo tanto, los adipocitos también se pueden ver como componentes integrales del sistema inmune (Omar et al. 2014). La contribución de los adipocitos en la inflamación de estos tejidos en la patogénesis de enfermedades relacionadas con la obesidad está bien establecida (Ghigliotti et al. 2014). La inflamación en adipocitos, a su vez, es un importante motor de la inflamación sistémica que vincula la obesidad con las enfermedades cardiovasculares.

Para entender las funciones inflamatorias del tejido adiposo, es necesario reconocer que éste, además de contener adipocitos, se encuentra integrado por diferentes tipos celulares, como macrófagos, preadipocitos, fibroblastos, linfocitos (al parecer pudiesen ser los encargados de la respuesta inflamatoria del tejido adiposo). Los macrófagos juegan un papel fundamental en la inflamación, tanto dentro del tejido adiposo como a nivel sistémico; sin embargo, los adipocitos también han demostrado funciones inflamatorias por sí mismos. Los adipocitos son sensibles a

diversos agentes infecciosos (similar a lo que presentan los macrófagos). Esta sensibilidad está mediada por los receptores tipo Toll (TLRs), que pueden ser activados por lipopolisacáridos, así como por mediadores inflamatorios que provienen de la circulación, como el TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11 (Nishimura, Manabe, and Nagai 2009).

Se han reportado niveles alterados de citocinas inflamatorias circulantes en adultos con sobrepeso y obesidad, dentro de las cuales se encuentran a TNF α , IL-6 o la proteína C – reactiva. Este tipo de eventos se han relacionado con el desarrollo concomitante de resistencia a la insulina, trastornos metabólicos y el aumento del riesgo cardiovascular observado en la obesidad. Se ha demostrado que el contenido de grasa corporal se correlaciona positivamente con los niveles séricos de proteínas inflamatorias, además es interesante observar que los marcadores de obesidad abdominal (por ejemplo, circunferencia de cintura) parecen estar más fuertemente asociados con marcadores inflamatorios que el IMC o la grasa corporal total, indicando un mayor impacto de la obesidad sobre la inflamación (de Heredia, Gómez-Martínez, and Marcos 2012).

Estas relaciones de obesidad-inflamación también se han descrito para individuos sanos. Por ejemplo, Hermsdorff et al., analizaron las asociaciones entre marcadores proinflamatorios y marcadores para grasa total y central, observaron que los índices como circunferencia de cintura y relación cintura-cadera estaban asociados con un aumento en proteína C-reativa, IL-6 y proteína de unión a retinol, mientras que el porcentaje total de grasa corporal se correlacionó sólo con IL-6 (Hermsdorff et al. 2011). Del mismo modo, Lapice et al, mostraron una relación positiva entre la proteína C-reativa y la grasa abdominal en sujetos sanos no obesos. Estas observaciones concuerdan con la hipótesis que el tejido adiposo visceral tiene un

comportamiento perjudicial sobre el tejido adiposo subcutáneo en los trastornos de salud asociados con la obesidad (Lapice et al. 2009).

Como se mencionó anteriormente, los adipocitos secretan un gran número de moléculas bioactivas de diferente naturaleza, denominadas colectivamente adipocinas, muchas de las cuales tienen acciones inmunomoduladoras, como es el caso de leptina y adiponectina, dos de las adipocinas más importantes (de Heredia, Gómez-Martínez, and Marcos 2012). La leptina puede regular la función inmune a varios niveles: estimula la proliferación de monocitos y la diferenciación en macrófagos, modula la activación de linfocitos natural killer (NKT) o induce la producción de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL- 6 o IL-12 (Tilg and Moschen 2006). En modelos animales, la ausencia de acción de leptina se ha asociado con una función inmune defectuosa. La leptina actúa como sensor del estado de las reservas de energía en el cuerpo, y cuando estas reservas se descompensan, la leptina actúa sobre el sistema nervioso central estimulando la saciedad y el gasto de energía. Por lo tanto, los niveles circulantes de leptina aumentan junto con la masa de grasa corporal. Sin embargo, es bien sabido que, en la mayoría de los casos, la obesidad se acompaña de una respuesta anormal a la acción de la leptina, y esto conduce a una situación de resistencia a la leptina e hiperleptinemia compensatoria, con posibles consecuencias sobre la activación de las células inmunes (de Heredia, Gómez-Martínez, and Marcos 2012).

Por otro lado, la adiponectina, una hormona antiinflamatoria y sensibilizadora de la insulina, ejerce acciones opuestas a la leptina. Inhibe la actividad fagocítica y la producción de TNF α en macrófagos, la diferenciación de precursores de monocitos, la síntesis de moléculas de adhesión endotelial y la formación de células espumosas (Koerner, Kratzsch, and Kiess 2005).

Además, estimula la liberación de interleucinas antiinflamatorias, como IL-10 o el agonista del receptor de IL-1. Además, a diferencia de la leptina, las concentraciones de adiponectina se correlacionan inversamente con el peso corporal. Por lo tanto, los cambios en los niveles de las dos adipocinas principales pueden contribuir al inicio y mantenimiento de la inflamación sistémica presente en la obesidad siendo un riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (de Heredia, Gómez-Martínez, and Marcos 2012).

1.5 Estructura de los vasos sanguíneos

Las arterias son las encargadas de llevar la sangre desde el corazón a los órganos, transportando el oxígeno y los nutrientes. Las arterias tienen paredes gruesas y ligeramente elásticas para soportar la presión. El músculo liso les permite contraerse y dilatarse para controlar la presión arterial y la cantidad de sangre que llega a los órganos. Su estructura es repetitiva y consiste en la disposición concéntrica de tres capas llamadas tunicas las cuales presentan diferentes tipos de tejido.

1.5.1 Túnica Íntima

La túnica íntima es la capa más interna de una arteria. Está compuesta por una capa de células endoteliales y está sostenida por la membrana elástica interna. Las células endoteliales están en contacto directo con el flujo sanguíneo (Godo & Shimokawa, 2017).

El endotelio no expresa sus funciones de manera homogénea ya que existe una heterogeneidad que depende del tipo de vaso y del territorio en el que se encuentre. Así, por ejemplo, la permeabilidad es especialmente importante en los endotelios capilares y su intensidad está restringida por el tipo de endotelio. Pero el endotelio vascular no es simplemente

una barrera que separa la sangre de la pared vascular, sino también un importante órgano que está implicado en numerosas actividades por su capacidad de modificar su funcionalidad y regular la síntesis de diversos factores, en respuesta a cambios humorales, químicos o mecánicos en la sangre o en las células sanguíneas (Godo and Shimokawa 2017).

El endotelio participa en diversas funciones entre las que destacan, las siguientes:

- El mantenimiento del tono vascular y, por tanto, de la presión arterial, mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Godo & Shimokawa, 2017).

- La capacidad de expresar moléculas de adhesión que a su vez controlan el reclutamiento de leucocitos al subendotelio, donde serán activados participando en el proceso inflamatorio (Godo & Shimokawa, 2017).

- La creación de una superficie no trombogénica por la presencia de cargas eléctricas negativas y por la síntesis de inhibidores de la agregación plaquetaria (Godo & Shimokawa, 2017).

1.5.2. Túnica Media

Formada por fibras musculares lisas de disposición circular. Dependiendo del tipo de arteria puede tener una constitución mayoritaria de fibras elásticas. Entre las fibras musculares hay cantidades variables de fibras colágenas, elásticas y sustancia fundamental amorfa (proteoglucanos). En la parte más cercana a la adventicia puede haber una concentración bien definida de fibras elásticas que se denomina lámina elástica externa (Lazaro-Suarez et al., 2011).

1.5.3. Túnica Adventicia

Es la envoltura más externa de la arteria y está formada por tejido conectivo fibroelástico donde la mayor parte de las fibras discurren paralelas al eje mayor del vaso. En su parte más externa, la adventicia se mezcla con el tejido conectivo que envuelve al órgano. En la túnica adventicia de los grandes vasos hay vasos sanguíneos más pequeños que le proporcionan a esta túnica y a la media el aporte de nutrientes, ya que no es posible ser nutridas por difusión a partir de la luz. A estos vasos pequeños se les denomina vasa vasorum. En la adventicia también se puede observar la presencia nervios y además, está en contacto con el tejido adiposo perivascular (Kattoor et al. 2017).

1.6. Tejido Adiposo Perivascular

La mayoría de los vasos sanguíneos están rodeados por tejido adiposo, denominado tejido adiposo perivascular (PVAT). El PVAT es un conjunto de diversos tipos celulares, incluyendo adipocitos, preadipocitos y células madre mesenquimales, embebidas en una matriz con microvasos (Eringa, Bakker, and van Hinsbergh 2012). En los seres humanos, el PVAT se encuentra en contacto directo con la túnica adventicia (capa más externa en los vasos sanguíneos) de la mayoría de las grandes arterias de conducción en el cuerpo, con la excepción de la vasculatura cerebral, y algunas capas microvasculares como el mesenterio (Omar et al. 2014).

El tipo y la cantidad de tejido adiposo es variable de unos lechos vasculares a otros. Por ejemplo, el tejido adiposo mesentérico es blanco, abundante, con poca vascularización y poca actividad metabólica. Al ser un tejido de depósito, su cantidad se modifica en función del estado nutricional del individuo. Por otro lado, el tejido adiposo periaórtico es principalmente marrón,

escaso, con un metabolismo muy activo, un gran número de mitocondrias y una rica inervación. Además, se han descrito diferencias histológicas entre los adipocitos periaórticos y los adipocitos perivasculares mesentéricos, estos últimos con un diámetro 4 veces superior (40 frente a 9mm) (Gálvez-Prieto et al. 2008).

Los adipocitos de tejido perivascular en humanos (en arterias coronarias) exhiben una apariencia, expresión génica y un patrón histológico más acorde con adipocitos blancos en lugar de adipocitos marrones (Chatterjee et al. 2009) (Chatterjee et al. 2013). Sin embargo, en comparación con los adipocitos subcutáneos y perirrenales derivados de los mismos sujetos, estos adipocitos perivasculares (PV) son de menor tamaño, menos eficientes en el almacenamiento de lípidos y expresan niveles más bajos de genes específicos de adipocitos, lo que podría indicar un estado reducido de la diferenciación adipogénica (Chatterjee et al. 2009). Por el contrario, estudios *in vitro* de adipocitos PV diferenciados de arterias humanas son más grandes en tamaño y exhiben una alta capacidad para formar cuerpos lipídicos (almacenamiento de lípidos), lo que sugiere que el origen y/o la diferenciación de los adipocitos PV es variable dependiendo del lecho vascular (Rittig et al. 2012).

En un principio, la mayor parte de los estudios relacionados con la fisiopatología vascular se centraban en la funcionalidad de la capa muscular y la función endotelial, caracterizando las diferentes sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras que modificaban el tono vascular, así como sus tipos y subtipos de receptores. Sin embargo, hasta hace pocos años, el PVAT se había considerado como un mero soporte estructural para el vaso y una reserva de energía. Actualmente, se conoce que en condiciones normales el PVAT puede disminuir la respuesta contráctil inducida por noradrenalina, debido a la liberación de numerosas adipocinas hacia las

otras capas del vaso sanguíneo. Por este motivo es interesante el papel que cumple el PVAT sobre la vasculatura (Gil-Ortega et al. 2008).

1.6.1 PVAT y la vasculatura

La función del PVAT, además de dar soporte estructural y ser una reserva de energía, es liberar numerosas moléculas biológicamente activas promoviendo la comunicación paracrina entre PVAT y la vasculatura asociada, debido a la ausencia de una capa que separe ambos tejidos. Los adipocitos del PVAT también pueden infiltrarse en la túnica adventicia para facilitar sus efectos sobre la inflamación local y el tono vascular (Chatterjee et al. 2009). Se ha demostrado que el PVAT modula la contractilidad vascular a través de la liberación paracrina de varios factores incluyendo la adiponectina (Löhn et al. 2002) (Lynch et al. 2013).

La adiponectina produce un efecto de vasodilatación por medio de dos mecanismos diferentes: a) el primero es por la producción de óxido nítrico (NO) por la fosforilación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y b) la activación de canales de K (Fésüs et al. 2007). Además, esta molécula tiene un papel protector sobre la función endotelial mediante la inhibición de la síntesis de citocinas inflamatorias. Por otra parte, la adiponectina cuenta con otros efectos benéficos sobre la vasculatura: a) aumenta la sensibilidad a insulina; b) estimula la oxidación de ácidos grasos (AG), c) inhibe las respuestas inflamatorias, etc. (Gil-Ortega et al. 2008).

Otro de los factores vasoactivos que puede liberar el PVAT es la leptina, una hormona que se sintetiza principalmente en el tejido adiposo. La leptina cumple un papel importante en la regulación del tono vascular con efectos contrapuestos. Por una parte, produce un efecto vasodilatador directo, dependiente de endotelio y mediado a través de mecanismos diferentes,

en función del tipo de lecho vascular. En arterias de conducción, como la aorta de rata, la leptina induce la síntesis endotelial de óxido nítrico provocando un efecto vasorrelajante (Vecchione et al. 2002). En cambio, en arterias de resistencia, como las arterias mesentéricas, la leptina induce vasodilatación mediada por el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (Lembo et al. 2000).

En relación con esto se encuentra el óxido nítrico, que además de liberarse en el ámbito vascular, también puede liberarse por el tejido adiposo blanco. Las enzimas encargadas de la formación de NO en el tejido adiposo son la eNOS, presente en las membranas de los adipocitos, y la iNOS (inducible), localizada en el citoplasma (Engeli et al. 2004). El NO liberado por el PVAT desempeña un papel importante en el metabolismo de este tejido haciendo interesante su relación con otras biomoléculas.

Actualmente, son varios los estudios que demuestran que el desarrollo de obesidad, tanto en modelos animales, como en humanos, está acompañado de un incremento significativo en la cantidad de PVAT provocando hipertrofia de adipocitos. Asimismo, este tejido adiposo tiene la capacidad de liberar una amplia variedad de citocinas inflamatorias, como IL-1, IL-6, IL-8, el TNF α , o MCP-1, entre otras. Estas citocinas no sólo parecen estar implicadas en el proceso inflamatorio característico de la obesidad, sino que también están relacionadas con el desarrollo de disfunción endotelial y de resistencia a insulina asociada a la obesidad (Gil-Ortega et al. 2008). Por lo tanto, la idea de que este tejido contribuye localmente al desarrollo de enfermedades cardiovasculares es una hipótesis que ha surgido desde hace algunos años, aunque hay varios estudios al respecto, los mecanismos son poco claros y se requiere de más estudios al respecto (Eringa, Bakker, and van Hinsbergh 2012).

2. ANTECEDENTES

Desde hace varios años se ha documentado la estrecha relación que existe entre la obesidad y los niveles elevados de la hormona TSH (Eke et al., 2013; Yaturu et al., 2004; Zhang et al., 2006). En algunos estudios de adultos eutiroideos con obesidad, la alta adiposidad se ha relacionado con aumento de TSH y triyodotironina libre o total; sin embargo, la T4 libre se encontraba levemente disminuida (Nannipieri et al. 2009).

En relación con estos antecedentes, se ha encontrado que el receptor a TSH (TSHR) se encuentra presente en adipocitos, y su expresión en el tejido adiposo visceral de ratones obesos se encuentra aumentada en comparación con los ratones de peso normal (Lu et al. 2012). Además, este aumento en la expresión de TSHR está relacionado con la diferenciación de los preadipocitos (Haraguchi et al., 1996; Valyasevi et al., 2002); ya que en experimentos donde estimularon células madre embrionarias de ratón con TSH se observó que la activación del TSHR produce un aumento en la adipogénesis (Petersen et al., 2008).

A pesar de los antecedentes que demuestran que la TSH puede jugar un papel importante en la génesis de la obesidad, también hay reportes en la literatura en los que no han encontrado una asociación entre las medidas de adiposidad y los niveles de TSH, T3 o T4 libre (Soriguer et al. 2011; Krause et al. 2016). Debido a estas discrepancias en los resultados, en los últimos años se ha puesto un mayor énfasis en el estudio de los efectos de la TSH como un posible mediador de inflamación, debido a su capacidad de inducir la liberación de citocinas proinflamatorias. Ya que la obesidad se caracteriza por la presencia de un estado inflamatorio sistémico crónico de bajo grado, en el cual se observa un desequilibrio en la síntesis de citocinas, un incremento en las

concentraciones de proteínas de fase aguda y otros mediadores inflamatorios, además de la activación de varias vías de la respuesta inmune (Hotamisligil et al., 1995; Shemesh et al., 2007). Al respecto, se ha reportado que la activación de TSHR en adipocitos además de regular su diferenciación, también estimula la síntesis y liberación de MCP-1, resistina e IL-6 (Lu et al. 2012). Por otra parte, estudios llevados a cabo en cohortes de pacientes con hipotiroidismo han relacionado los altos niveles de TSH con un aumento en la concentración plasmática de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6, y otras proteínas como resistina y leptina, (Eke et al., 2013; Yaturu et al., 2004). La presencia de este proceso inflamatorio se ha relacionado con cambios a nivel vascular que puede desencadenar la presencia de disfunción endotelial y aterosclerosis (Taddei et al., 2006; Turemen et al., 2011), las cuales son el primer paso para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, padecimiento que ocupa el primer lugar de mortalidad a nivel mundial (Shemesh et al., 2007). En este sentido, se reportó que niveles elevados de TSH (>10mUI/mL) se asocian con el desarrollo de enfermedad coronaria y muerte por este padecimiento en una cohorte de pacientes con hipotiroidismo (Rotondi et al., 2010). Por lo que se ha sugerido que los niveles altos de TSH pudieran ser un marcador de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular (Rotondi et al., 2010). Sin embargo, el efecto de TSH sobre la vasculatura está poco estudiado. Recientemente, se ha descrito la presencia del TSHR en células endoteliales (HUVEC) y su activación produce disminución en la expresión de los factores relajantes como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), mientras que aumenta el factor contráctil endotelina 1 (ET-1) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1), de manera similar a como ocurre en la disfunción endotelial (Tian et al. 2014a).

A pesar de existir varios antecedentes de la presencia del TSHR en el tejido adiposo visceral y subcutáneo, así como su papel en la síntesis de citocinas proinflamatorias en estos tejidos, hasta la fecha se desconoce su presencia e importancia fisiológica y/o patológica en el PVAT. El cual ha sido descrito como un tejido que participa de manera importante en la regulación del tono vascular debido a su cercanía estructural con los vasos y a su capacidad de liberar sustancias vasoactivas (Lu et al. 2012). Por lo que en este trabajo se propone estudiar si el PVAT expresa al TSHR, así como determinar si su activación se relaciona con cambios en la función vascular que se observan en la obesidad.

3. JUSTIFICACIÓN.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en todo el mundo la obesidad casi se ha duplicado desde 1980. Esto se debe a profundos cambios en la disponibilidad, calidad, cantidad y fuente de alimentos que se consumen en muchos países, combinado con una disminución en los niveles de actividad física entre la población (OMS, 2016). En el caso específico de México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016 indica que los niveles actuales de sobrepeso y obesidad en la población mexicana representan una amenaza para nuestro sistema de salud. Una de las causas es su asociación con las enfermedades no transmisibles y los altos costos que conlleva darle seguimiento a estas enfermedades. Las enfermedades no transmisibles con mayor prevalencia e incidencia son la diabetes mellitus, los tumores malignos y las enfermedades cardiovasculares (ENSANUT, 2016).

De acuerdo con estos antecedentes resulta de gran importancia estudiar los mecanismos celulares y moleculares que se desarrollan en el PVAT para tratar de comprender los procesos degenerativos que la obesidad podría causar sobre el tono vascular. En especial queremos saber si existe un efecto pro inflamatorio causado por la activación del TSHR en el PVAT debido a una dieta de cafetería, y a su vez los efectos que puede desarrollar el PVAT sobre la regulación del tono vascular y la expresión de citocinas proinflamatorias que, junto con la disfunción endotelial, son el primer paso para el desarrollo de aterosclerosis.

4. HIPÓTESIS

El TSHR está presente en el PVAT de ratas obesas y su activación se relaciona con un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias y cambios con el tono vascular de la aorta.

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo general:

- Determinar la presencia del TSHR en el tejido adiposo periaórtico y su relación con la expresión de citocinas proinflamatorias en la modulación del tono vascular.

Objetivos particulares:

- Identificar la presencia de TSHR en el tejido adiposo periaórtico de ratas.
- Determinar los cambios en la expresión de TSHR del tejido adiposo periaórtico de ratas con obesidad inducida por una dieta de cafetería.
- Determinar los cambios en el tono vascular de la aorta producidos por la activación de los TSHR.
- Determinar cambios en la expresión de citocinas ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β , leptina y adiponectina) del tejido adiposo periaórtico de ratas con obesidad inducida por dieta de cafetería.
- Determinar cambios en la síntesis de IL-6 y $\text{TNF}\alpha$ del PVAT y la aorta causados por la activación de los TSHR.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Animales y condiciones de experimentación

Se utilizaron 21 ratas Sprague Dawley machos de 2 meses de edad obtenidas del bioterio del Hospital de Especialidades del CMN SXXI, las cuales se dividieron en 3 grupos:

- Grupo 1. Control (7 ratas). Ratas de 2 meses con dieta estándar. En este grupo se hicieron las determinaciones basales de los parámetros a medir. Se midió el consumo de alimento y la ingesta de agua semanalmente.
- Grupo 2. Dieta de cafetería (7 ratas). La dieta de cafetería (CAF) se refiere a la alimentación basada en una variedad de alimentos comerciales. La mayor parte de los elementos seleccionados son altos en grasa y azúcar, así como hipercalóricos, en comparación con el alimento estándar. Típicamente, este régimen conduce a hiperfagia, un aumento en la ingesta de energía y obesidad (Shafat, Murray, and Rumsey 2009; Sampey et al. 2011a). Para este trabajo, nos basamos en las condiciones reportadas Shafat y colaboradores (2011). La lista de alimentos junto con el contenido energético se encuentra en la sección de anexos.
- Grupo 3*. Dieta fructosa (7 ratas), ratas de 2 meses de edad con dieta estándar. Se agregó fructosa al 10% disuelta en agua. Se midió el consumo de alimento y la ingesta de agua diariamente.

Todos los grupos tuvieron libre acceso a alimento estándar (Formulab Chow 5008, Purina). Se midió el consumo de alimento diariamente, así como su peso corporal semanalmente.

Posteriormente se calculó el aumento de peso corporal correspondiente. La dieta se administró durante 15 semanas, ajustando semanalmente la cantidad de alimento suministrado cuando fue necesario, de acuerdo con la ganancia de peso y la ingesta de los animales.

Durante todo el tiempo los animales estuvieron en condiciones controladas de temperatura, humedad y periodos de luz/oscuridad (12/12). En cajas de acrílico con cama limpia y estéril, de acuerdo a lo que especifica en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO para el manejo y cuidado de animales de laboratorio.

6.3. Disección

Al término de las 15 semanas de dieta, los animales se sacrificaron anestesiándolos con pentobarbital sódico (30-50 mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal (I.P.). Se recolectó la sangre total mediante punción cardiaca, en un tubo morado que contenía EDTA como anticoagulante y uno rojo sin anticoagulante para la obtención de plasma y suero, respectivamente. Posteriormente se extrajo la arteria aorta junto con el tejido adiposo periaórtico. Se colocó en una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) en frío y se cortó en fragmentos que fueron guardados en Tripure® para la extracción de RNA o en medio de cultivo (DMEM) para las pruebas preliminares de incubación con TSH según fuera el caso.

6.4. Concentraciones de TSH por medio de ELISA

Se realizó la cuantificación sérica de TSH, por medio del kit de ELISA para murinos (ABNOVA). Para lo cual se utilizó el suero obtenido por punción cardiaca. Este método se basa en el principio de un ensayo inmunoabsorbente en fase sólida con enzima conjugada, es una ELISA tipo sándwich directa.

Los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente antes de comenzar. Los estándares se encontraban liofilizados, así que se reconstituyeron con 1 mL de standard/simple diluent, una vez reconstituido se guardaron a -20 °C hasta su uso. Por otra parte, la solución amortiguadora de lavado se diluyó con agua destilada 1 parte con 19 partes de agua (es estable de 1 a 3 meses a 4-8 °C).

Se dividió la placa en tres partes, una para la curva estándar (100 µL por estándar: 0, 1, 2.5, 5, 10, 25 ng/mL), otra para los controles de calidad (100 µL de cada uno QC1 1.5-2 ng/mL y QC2 4-5 ng/mL) y la última para las muestras (100 µL suero por muestra). Se agregaron 100 µL de la enzima conjugada a cada pozo y se agitó la placa por 30 s, posteriormente, se incubó a 37 °C en baño María por 3 horas en una bolsa sellada. Se removió la mezcla de incubación por decantación de la placa en un contenedor, se enjuagaron y decantaron los pozos cinco veces con la solución amortiguadora de lavado. Se agitó la placa rápidamente en un papel absorbente hasta remover todas las gotas. Por último, se agregaron 100 µL de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina) en cada pozo y agitó 10 s e incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Para detener la reacción se adicionaron 50 µL de la solución stop (HCl 2N) en cada pozo, luego se agitó por 30 s, y se observó el cambio de color azul a amarillo. Se tomó la lectura a una densidad óptica de 450 nm.

6.5. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó homogenizando el PVAT que se obtuvo de la aorta en 1 mL de Tripure® (ROCHE) a 4 °C. Después se adicionaron 200 µL de cloroformo, se agitó 15 s y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Se centrifugó a 1400 rpm durante 15 min a 4

°C, se extrajo la fase acuosa y se adicionaron 500 µL de isopropanol para precipitar el RNA y se centrifugó a 1400 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 1mL de etanol al 75% en agua DEPC (Dietilpirocarbonato) en 2 ocasiones, centrifugando durante 10 min a 12000 rpm para compactar el RNA, se decantó el etanol y se dejó secar durante 10-20 min para eliminar el exceso de etanol. El RNA se disolvió en 30 µL de RNA storage solution (buffer de citrato de sodio 1M, Ambion).

La integridad del RNA se verificó corriendo las muestras en un gel de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturizantes. En el transiluminador Gel Doc 2000 Bio Rad se observaron las bandas pertenecientes a la subunidad mayor y menor del RNA ribosomal 28s y 18s respectivamente. Para determinar la concentración y pureza del RNA se colocaron 2 µL de muestra en el espectrofotómetro Epoch, el cual realiza lecturas a diferentes longitudes de onda: 260 nm, 280 nm y 320 nm en los que determina la concentración de RNA, proteínas y contaminación con disolventes, respectivamente. Conjuntamente, se evaluó la relación 260/280 la cual se encontró entre 1.8-2 para considerarla una muestra de buena calidad.

Posteriormente, a 1 µg de RNA total se le adicionó 1µL del amortiguador de reacción con MgCl₂ 10x, 1µL de DNasa I, RNasa-free (#EN0521) y agua libre de nucleasas suficiente para 10µL de volumen total de reacción, este paso se realizó a 4 °C. Posteriormente se incubó a 37 °C por 30 min, al terminar la incubación se adicionó 1 µL de EDTA 50 mM, el cual es un agente quelante y detuvo la reacción. El RNA se encontraba listo para utilizarse en la reacción de transcriptasa reversa.

Para la reacción de la transcriptasa reversa se usó 1µg del RNA total, teniendo en consideración que 1 unidad a 260 nm equivale a 40 g de RNA. Para la obtención de cDNA se utilizó el kit ImProm II Reverse Transcription System (Promega), que utiliza la enzima transcriptasa reversa en presencia de los cebadores oligo(dT) que hibridan con el mRNA y random primers que se unen aleatoriamente al RNA. La reacción se llevó a cabo con una primera incubación a 25°C por 15 min, después se dejó durante 55 min a 42°C, para detener la reacción se elevó la temperatura a 70°C durante 15 min y por último las muestras se enfriaron a 4°C por 5 min.

6.6. PCR-Tiempo Real

Se tomó 1 µl del cDNA para la reacción en cadena de la polimerasa que se realizó con el kit DNA master plus SYBR Green 1 (Roche) que contiene la enzima Fast Start. Se utilizó el equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), para lo cual se usó el cebador específico para el gen a estudiar “receptor a TSH” (TSHR) además de las adipocinas TNFα, IL-1B, adiponectina, leptina y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) (las secuencias de los cebadores se muestran en la sección de anexos). La detección se realizó midiendo la fluorescencia generada por el compuesto SYBR Green, al intercalarse en las cadenas de DNA. Como gen de referencia en cada experimento se utilizó el gen β-actina. Para el PCR se utilizó el programa de amplificación para SYBR Green que consiste en un periodo de 10 min a 95°C para la pre-incubación de la enzima y desnaturalización del DNA, posteriormente se llevó a cabo un programa de 35 a 40 ciclos, cada uno de los cuales se constituyó de una fase de alineamiento a 61°C por 7s, seguido de la amplificación a 72°C por 10s.

Para verificar la amplificación específica de los cebadores, se determinó la temperatura de fusión T_m (melting), la cual consiste en el seguimiento de desnaturalización de los cebadores mediante el incremento gradual de la temperatura hasta que se observa la pérdida de la fluorescencia.

Los cambios en la expresión del mRNA entre los diferentes grupos se determinaron con el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$ de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \left(\text{Gen}_{\text{de interés}} - \text{Gen}_{\text{referencia}} \right)_{\text{Grupo experimental}} - \left(\text{Gen}_{\text{de interés}} - \text{Gen}_{\text{referencia}} \right)_{\text{Grupo control}}$$

6.7. Concentraciones de Citocinas

Al finalizar el tratamiento con dieta CAF los animales se sacrificaron anestesiándolos con pentobarbital sódico vía intraperitoneal (I.P.) con una dosis de 30-50 mg/Kg. A partir de esta muestra, se realizó la disección de la aorta y el PVAT. En seguida, los tejidos se incubaron por separado en una placa de cultivo con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) y posteriormente se dividieron para agregar diferentes concentraciones de TSH a diferentes tiempos (Antunes et al. 2008). Quedando de la siguiente manera:

Aorta:

- TSH a 10 mUI/mL por 1 hora, 3 horas y 6 horas.
- TSH a 100 mUI/mL por 6 horas.

PVAT:

- TSH a 10mUI/mL por 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas.

- TSH a 100mUI/mL por 1 hora, 3 horas, 6 horas y 24 horas.

Los tejidos se incubaron a 37 °C con atmósfera de 5% de CO₂ en placas de cultivo con medio DMEM, con TSH en las concentraciones y tiempos que se indican anteriormente. Terminadas las incubaciones con los diferentes tiempos se recuperaron los sobrenadantes del medio en tubos eppendorf de 1.5mL y los tejidos se pesaron.

A partir de los sobrenadantes se midieron los niveles de citocinas TNF α e IL-6 para cada tejido (aorta y PVAT) de cada una de las ratas de los diferentes grupos. Las concentraciones de citocinas se cuantificaron por el método de ensayo Luminex, con estuche comercial de Procarta Plex Mix&Match Rat 2-plex (IL-6 y TNF α) (Affymetrix); siguiendo el procedimiento descrito en la hoja técnica.

6.8. Experimentos de tono vascular.

Para evaluar los cambios vasculares producidos por TSH se utilizaron seis ratas macho Sprague Dawley de la misma edad que el grupo control alimentado con dieta estándar. Se sacrificaron con pentobarbital sódico y se disecó la arteria aorta torácica y se cortó en anillos de aproximadamente 5 mm de longitud. Se obtuvieron anillos con y sin PVAT en presencia o ausencia de endotelio. El PVAT se retiró cuidadosamente con tijeras, mientras que el endotelio se removió mecánicamente frotando la luz arterial con un estilete rugoso. Los anillos se montaron en cámaras para tejido aislado conteniendo 10 mL de solución Krebs-Ringer bicarbonato pH 7.4 a 37 °C y con oxigenación constante (95%:5% de O₂:CO₂). Los anillos estuvieron sujetos por un extremo a la base de la cámara y por el otro a un transductor de tensión isométrica que a su vez está acoplado a un sistema computarizado de registro Biopac. Se dio una tensión inicial de 3 g a partir de la cual

los anillos se pudieron contraer o relajar. Para estabilizar el tejido, se realizaron contracciones con una concentración submáxima de fenilefrina (10^{-6} M) cada 30 min por tres ocasiones. La integridad del endotelio se verificó por su capacidad relajante a Acetilcolina (10^{-6} M) en la tercera contracción con fenilefrina. Después de un periodo de recuperación de 30 min se realizó una curva de contracción a fenilefrina (10^{-9} a 10^{-5} M). Posteriormente se dejó un periodo de recuperación de aproximadamente una hora realizando el lavado del tejido para regresar al estado basal y realizar una segunda curva de contracción (10^{-9} a 10^{-5} M) en presencia de TSH.

Los anillos se incubaron con diferentes concentraciones de TSH (0.1, 1 y 10mUI/mL) durante 30 min, antes de la realización de la segunda curva concentración-respuesta a fenilefrina. Durante el tiempo de incubación se registraron los cambios en la contracción que pudieran producir las diferentes concentraciones de TSH utilizadas.

6.9 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) o t-student, dependiente del número de grupos, para determinar diferencias significativas entre los grupos con respecto al control, utilizando como prueba complementaria la prueba Dunnett, según la distribución de los datos con una $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

Peso Corporal y Consumo Energético.

Se cuantificó el peso corporal en el grupo Control y los grupos experimentales (CAF y Fructosa) semanalmente (Figura 1). Además, conforme a la información nutrimental en las etiquetas del alimento estándar y la dieta CAF (diversos productos comerciales) se calculó el consumo semanal de calorías, carbohidratos, grasa y proteína de los tres grupos (Figura 2, 3, 4 y 5 respectivamente) durante las 15 semanas del tratamiento.

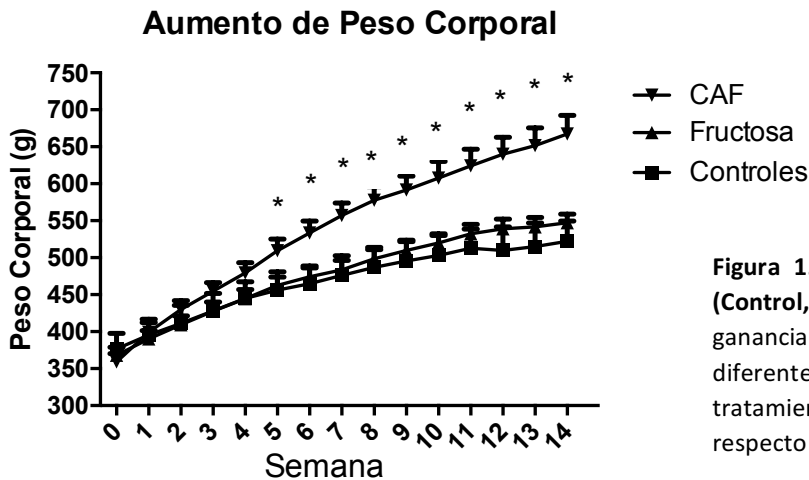


Figura 1.- Peso Corporal de los 3 grupos (Control, Fructosa y CAF). Se muestra la ganancia de peso corporal (en gramos) de los diferentes grupos durante las 15 semanas de tratamiento. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

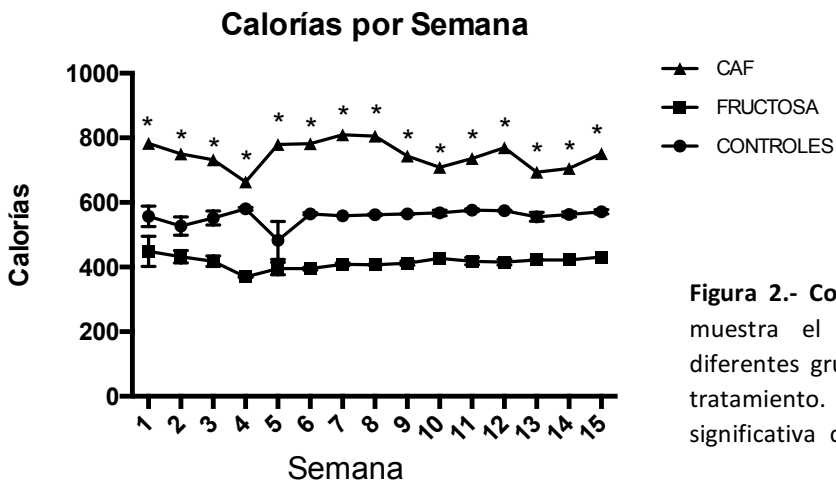


Figura 2.- Consumo de Calorías Semanal. Se muestra el consumo de calorías de los diferentes grupos durante las 15 semanas de tratamiento. Media +/- D.E. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

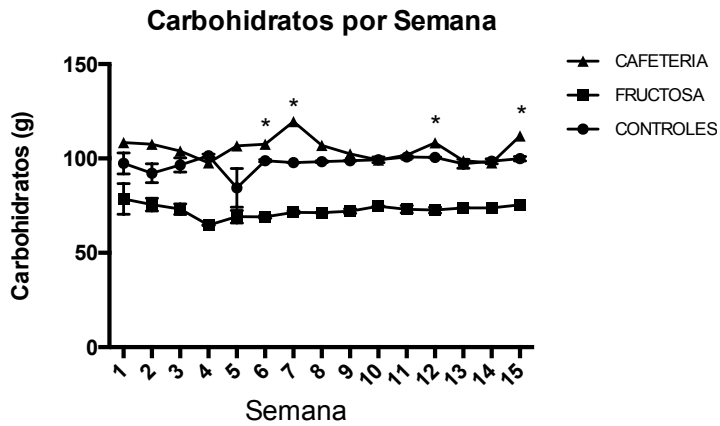


Figura 3.- Consumo de Carbohidratos Semanal. Se muestra el consumo de carbohidratos (gramos) de los diferentes grupos durante las 15 semanas de tratamiento. Media +/- D.E. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

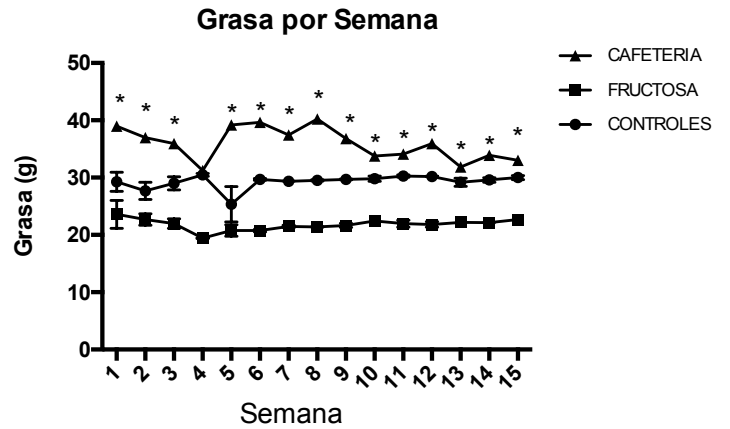


Figura 4.- Consumo de Grasa Semanal. Se muestra el consumo de grasa (gramos) de los diferentes grupos durante las 15 semanas de tratamiento. Media +/- D.E. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

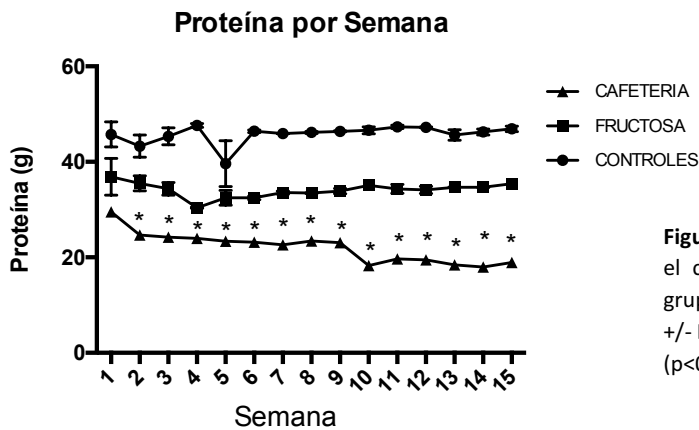


Figura 5.- Consumo de Proteína Semanal. Se muestra el consumo de proteína (gramos) de los diferentes grupos durante las 15 semanas de tratamiento. Media +/- D.E. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$)

Se realizó el cálculo semanal de las calorías consumidas para asegurar que la dieta de cafetería fuera hipercalórica (Figura 2). Se encontró diferencia significativa desde la primera semana hasta las 15 semanas en la dieta de cafetería, lo que indica que esta dieta de cafetería es hipercalórica con respecto a la dieta estándar del grupo control. Además, se organizaron los datos por grupo nutrimental, en carbohidratos, grasa y proteína consumidos por semana en los cuales

también se encontró diferencia significativa desde las primeras semanas excepto carbohidratos los cuales se mantuvieron casi de la misma manera que el grupo control (Figuras 3 a 5).

Análisis Bioquímicos.

Se evaluaron los parámetros bioquímicos como el perfil lipídico (HDL y triglicéridos), glucosa y colesterol total (Tabla 1). No se encontraron cambios significativos en ningún parámetro de Dieta de Cafetería. En relación al grupo Fructosa se encontró una disminución en Colesterol total y HDL. Probablemente es necesario que el tiempo de consumo de alimentos hipercalóricos sea más prolongado para encontrar alterados estos parámetros.

Tabla 1.- Parámetros Bioquímicos. M+/- D.E. Evaluados a las 15 semanas

Parámetro/Grupo	Control	Fructosa	Cafetería
Glucosa (mg/dL)	165.38 ± 14.37	171.83 ± 12.55	164.03 ± 12.28
TG (mg/dL)	92.00 ± 22.19	113.1 ± 9.25	102.23 ± 31.37
Colesterol Total (mg/dL)	67.35 ± 6.15	52.03 ± 1.43*	63.5 ± 4.41
HDL (mg/dL)	52.83 ± 4.06	38.73 ± 0.86*	41.34 ± 6.41

Concentración Sérica de TSH (ELISA)

Además de los objetivos de este proyecto, se determinó si la obesidad inducida por la dieta de cafetería tenía consecuencias en el aumento de la TSH sérica, para lo cual se utilizó una prueba de ELISA. Los resultados muestran que los niveles de TSH tienen una mediana de 2.17-2.46 ng/mL y de 2.13-4.30 ng/mL en el grupo control y de cafetería respectivamente. A pesar de que se observa aumento en los niveles de TSH por la dieta de cafetería, este cambio no es

estadísticamente significativo. Sin embargo, hay una tendencia al aumento de la hormona en los grupos experimentales.

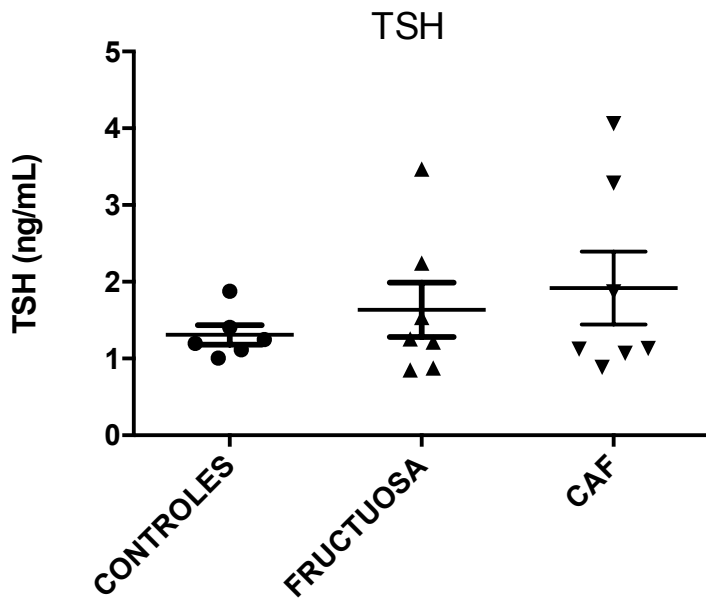


Figura 6.- Concentraciones séricas de TSH. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de TSH en todos los grupos al final del tratamiento.

PCR-Tiempo Real

Para el análisis de la expresión del receptor a TSH se utilizaron como controles positivos diferentes tejidos del grupo control de acuerdo con el trabajo realizado por Regard y colaboradores (Regard, Sato, and Coughlin 2008b). En la figura 7 se observa la expresión de TSHR en diferentes tejidos del grupo control (Tejido Adiposo Epididimal, T.A. Retroperitoneal, T.A. Subcutáneo, Cerebro, Tiroides, PVAT y Aorta) siendo los tres primeros los que muestran una mayor expresión del receptor.

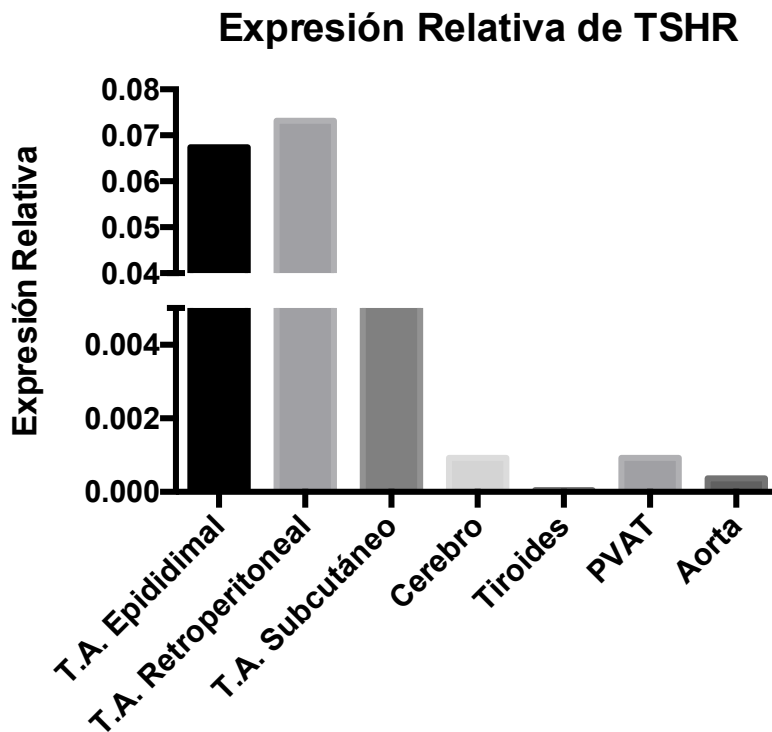


Figura 7.- Expresión de TSHR. Se muestra la expresión de TSHR en diferentes tejidos del grupo Control. Media +/- D.E.

Una vez que se verificó la presencia del TSHR en el PVAT y se evaluó si la obesidad inducida por dieta CAF produce cambios en la expresión de TSHR del tejido adiposo periaórtico, así como en la aorta (Figura 8 y 9). En cuanto a la expresión del TSHR en el PVAT, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tres grupos analizados. Por otro lado, en la arteria libre de tejido adiposo del grupo CAF y Fructosa, encontramos una disminución significativa en la expresión de TSHR con respecto al grupo control.

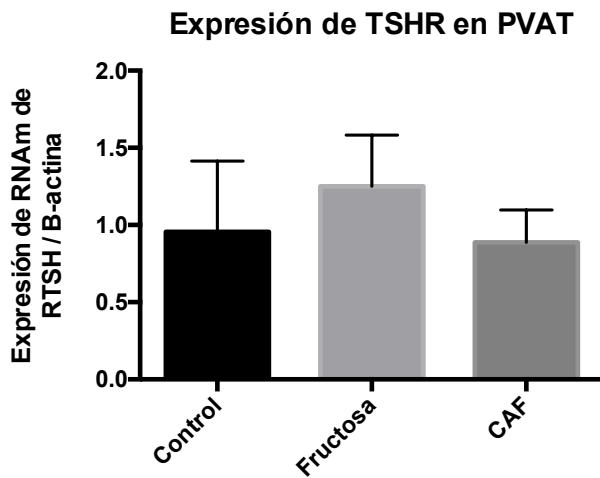


Figura 8.- Expresión de TSHR en PVAT. Se muestra la expresión de TSHR en el PVAT del grupo Control, Fructosa y CAF. Media +/- D.E.

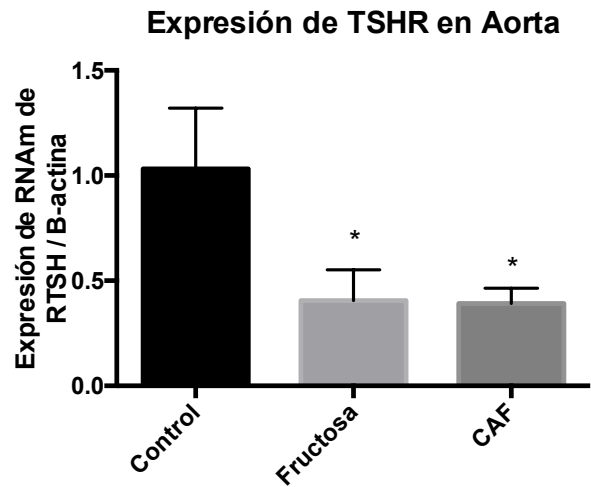


Figura 9.- Expresión de TSHR en Aorta. Se muestra la expresión de TSHR en la aorta del grupo Control, Fructosa y CAF. Media +/- D.E. *Diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$) ANOVA.

Además, se quiso identificar si la obesidad produce cambios en la expresión de diferentes adipocinas (TNF α , IL-1B, Adiponectina, Leptina y MCP-1) en el PVAT. Por lo que se comparó la expresión entre el grupo control y el de dieta de cafetería. Debido a que el grupo CAF fue el único en producir obesidad, ya no se incluyó al grupo de dieta con fructosa en los siguientes resultados. En las figuras 10 a 14 se muestran las gráficas de expresión para cada uno de los genes mencionados. Como se observa en las gráficas, ninguno de los genes mostró diferencia significativa con respecto al control. Sin embargo, en algunos casos, la dispersión de los datos fue muy grande y es necesario ampliar la “n” para observar diferencias significativas.

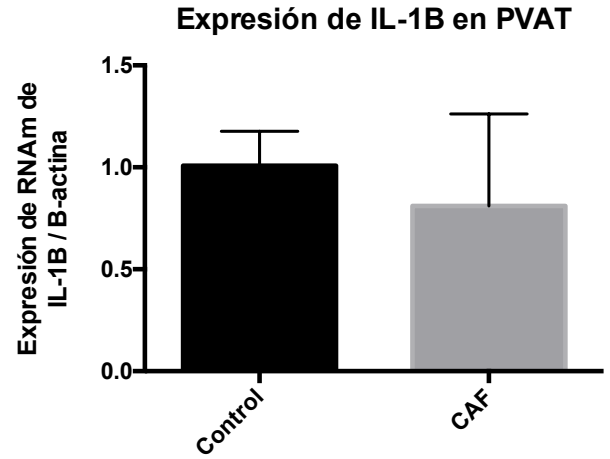
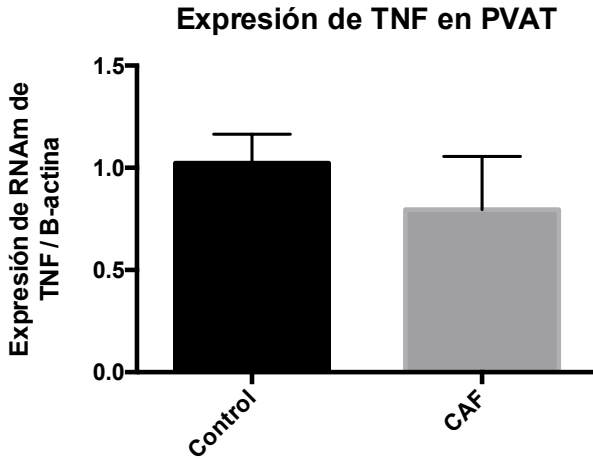


Figura 10 y 11.- Expresión de TNF α e IL-1B en PVAT. Se muestra la expresión de los genes en el PVAT del grupo Control y CAF. Media +/- D.E.

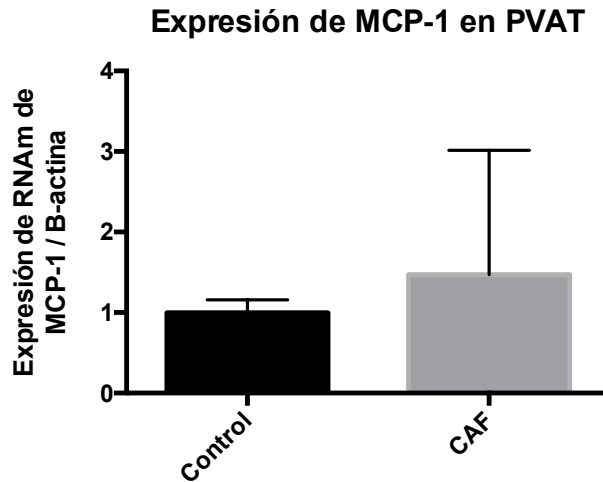


Figura 12.- Expresión de MCP-1 en PVAT. Se muestra la expresión del gen en el PVAT del grupo Control y CAF. Media +/- D.E.

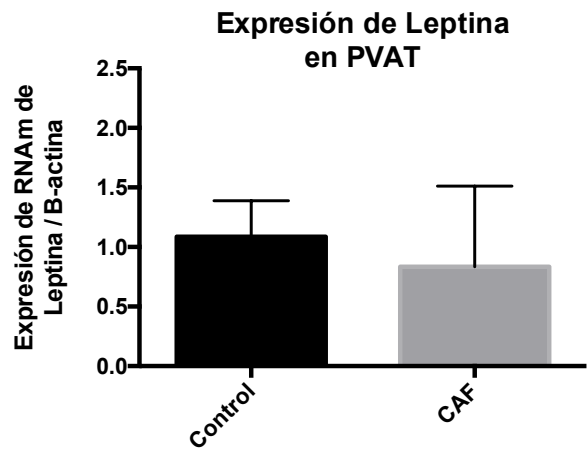
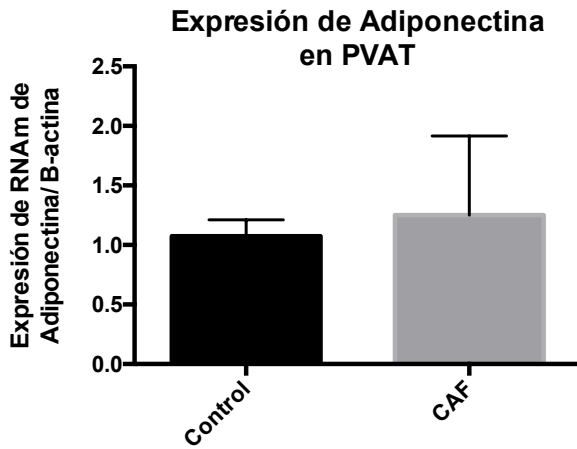


Figura 13 y 14.- Expresión de TNF α e IL-1B en PVAT. Se muestra la expresión de los genes en el PVAT del grupo Control y CAF. Media +/- D.E.

Concentración de TNF α e IL-6 por estimulación con TSH

Para determinar el efecto de TSH sobre la producción de citocinas en el TAPV y en la aorta. Se cuantificaron las concentraciones TNF α e IL-6 después de la incubación con TSH en el tejido aórtico y el PVAT. Con respecto a la aorta (Figuras 15 y 16), se observa que la incubación con TSH (10mUI/mL) produce un aumento en la concentración de TNF α e IL-6 el cual fue dependiente del tiempo de exposición, con un pico máximo a las 6 horas después de haber agregado el estímulo con TSH. Además, se observó que en el grupo de cafetería la producción de estas citocinas parece ser menor que en el grupo control. Sin embargo, estos cambios no fueron estadísticamente significativos.

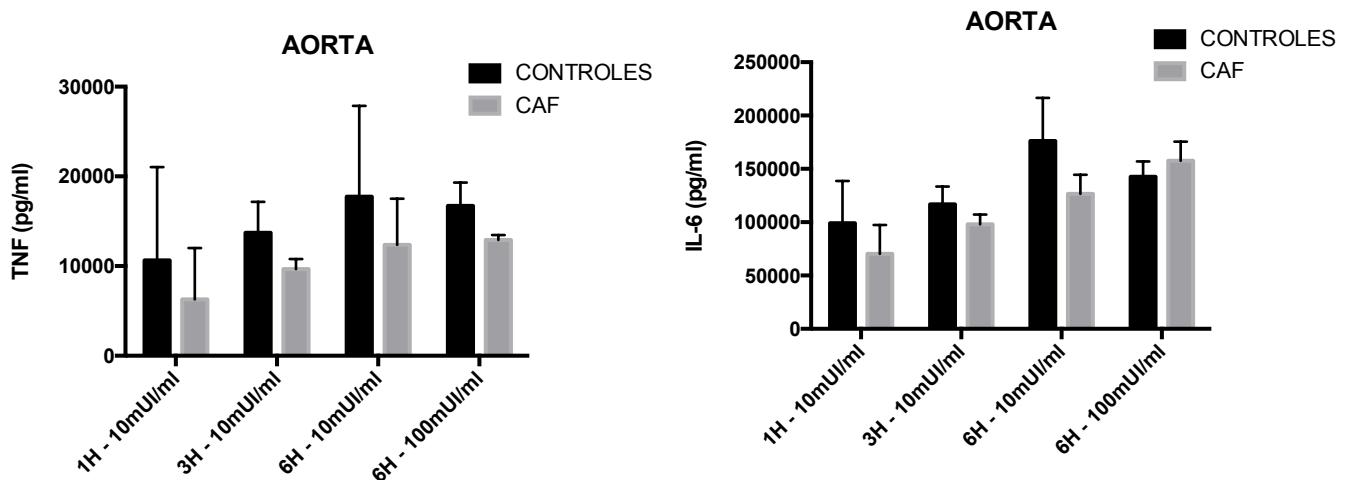


Figura 15 y 16.- Concentraciones de TNF e IL-6 después del estímulo con TSH. Se determinaron las concentraciones de las citocinas TNF e IL-6 después de estimular el tejido (aorta) con diferentes concentraciones de TSH (10mIU y 100mIU) a diferentes tiempos (1h, 3h y 6h). Media +/- D.E.

Por otro lado, para determinar el tiempo de incubación y la concentración adecuada de TSH para el PVAT, se utilizaron 4 tiempos de incubación (1, 3, 6 y 24 horas) con 2 concentraciones de TSH (10 y 100 mUI/mL), y se cuantificaron las concentraciones de las citocinas TNF α e IL-6. Al comparar las diferentes condiciones de incubaciones encontramos que a las 6 horas y con la concentración de 100 mUI/mL de TSH, se observó la mayor concentración de TNF α e IL-6 (Figura 17 y 18).

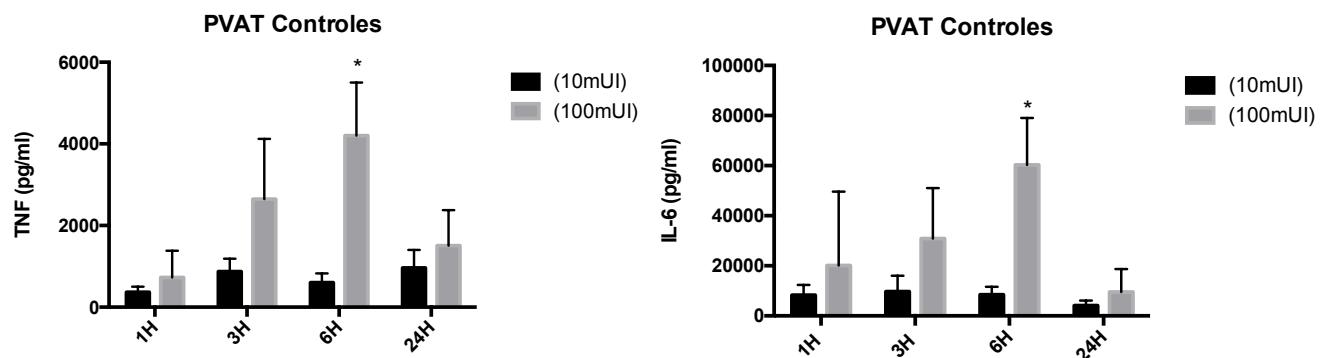


Figura 17 y 18.- Concentraciones de TNF e IL-6 después del estímulo con TSH en grupos control de PVAT. Se determinaron las concentraciones de las citocinas TNF e IL-6 después de estimular el tejido (PVAT) con 10mUI y 100mUI de TSH a diferentes tiempos. Media +/- D.E. (p<0.05)

Con los resultados obtenidos anteriormente, se utilizó la concentración de 100 mUI/mL de TSH para ver el efecto de la obesidad inducida por la dieta de cafetería a las 6 horas de incubación y encontramos que el grupo CAF mostró una disminución significativa de TNF α con respecto al control (Figura 19).

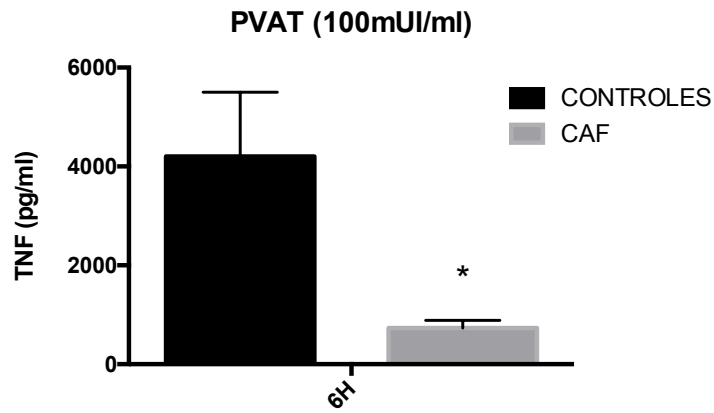


Figura 19.- Concentración de TNF después de la incubación con TSH 100 mUI/mL durante 6 horas. Se determinaron las concentraciones de la citocina TNF después de estimular el tejido (PVAT) con 100mUI/mL de TSH durante 6 horas. Media +/- D.E. ($p < 0.05$)

Con respecto a la concentración de IL-6 producidas por el PVAT después del estímulo con TSH 100mUI (Figura 20), el grupo de cafetería mostró una disminución significativa con respecto al control.

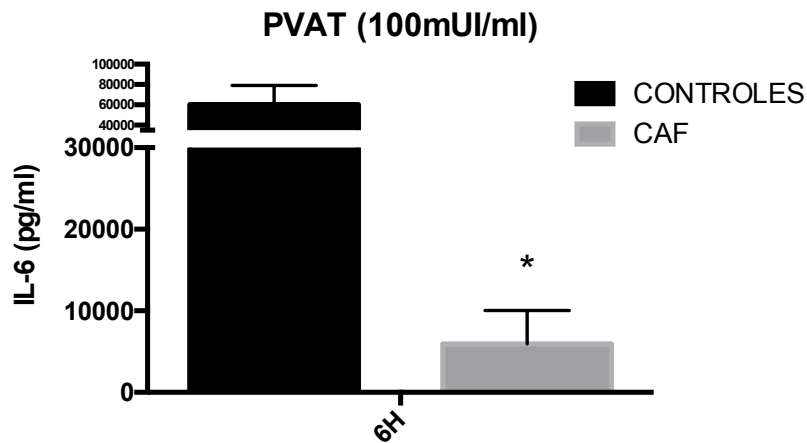


Figura 20.- Concentración de IL-6 después del estímulo con TSH 100mUI/mL durante 6 horas. Se determinaron las concentraciones de IL-6 después de estimular el tejido (PVAT) con 100 mUI/mL de TSH durante 6 horas. Media +/- D.E. ($p < 0.05$)

Los resultados obtenidos sugieren que la incubación del TAPV con TSH produce un aumento en la concentración de TNF α e IL-6; sin embargo, en la obesidad inducida por dieta de cafetería la producción de estas citocinas disminuye con respecto al control.

Tono Vascular

Para determinar el efecto de TSH sobre la regulación del tono vascular, se realizaron curvas concentración-respuesta a fenilefrina en presencia o ausencia de TSH (10 mUI/mL). Para lo cual se utilizaron anillos aórticos obtenidos de las ratas del grupo control con PVAT (Figura 21) y sin PVAT (Figura 22) y encontramos una disminución significativa de la respuesta a fenilefrina en los anillos incubados con TSH, pero solo en los anillos con PVAT. Estos resultados sugieren que la incubación con TSH podrían estar aumentando el efecto anticontráctil del PVAT posiblemente por la producción de factores relajantes producidos en el PVAT.

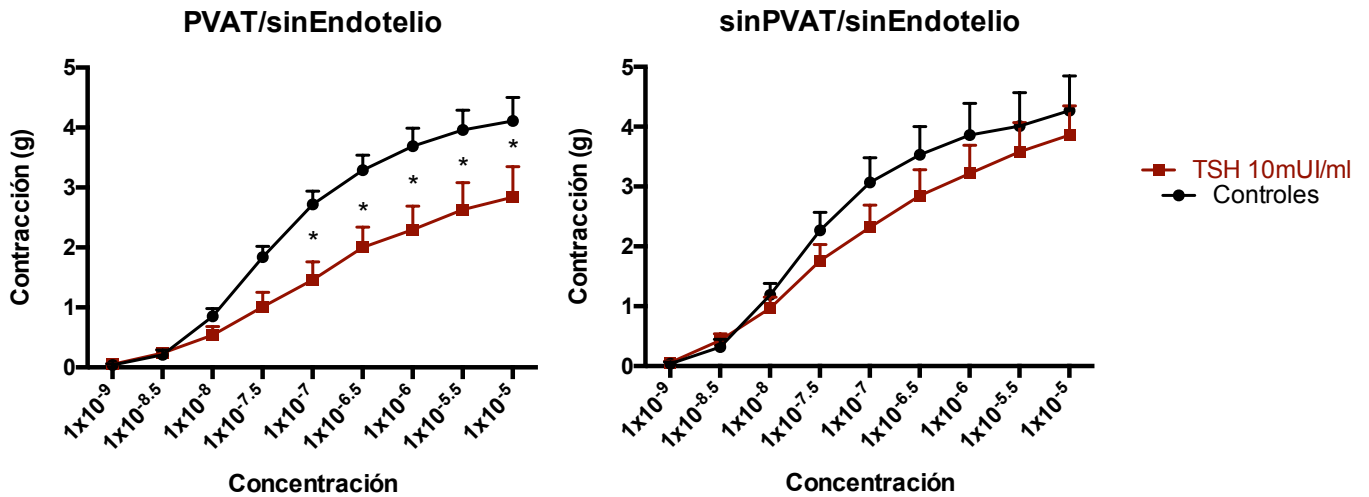


Figura 21 y 22.- Curva concentración-respuesta a fenilefrina en anillos aórticos con y sin TAPV. Se realizó una curva de concentración-respuesta a fenilefrina incubando el tejido previamente con 10mUI/mL de TSH durante 30 minutos. Media +/- D.E. ($p < 0.05$) $n = 7$.

Por otro lado, al evaluar la respuesta directa de TSH sobre la respuesta vascular de los anillos aórticos encontramos que al incubar los anillos aórticos con la concentración de 10 mUI/mL se producía contracción arterial (Figura 27). Además, este efecto fue mayor en los anillos a los que les fue removido tanto el endotelio como el PVAT. Lo que sugiere que la estimulación de TSH tiene un papel diferencial dependiendo del tejido sobre cual está actuando, ya que a nivel de endotelio y de PVAT modula la contracción que produce directamente sobre el musculo liso vascular.

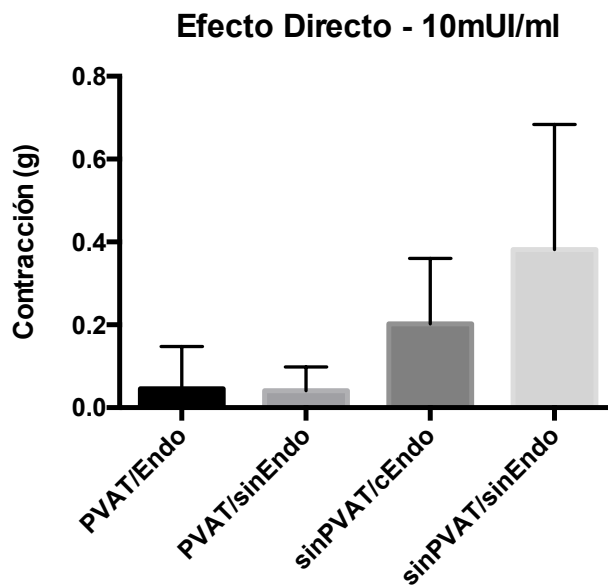


Figura 23.- Efecto Directo de TSH sobre Anillos Aórticos. Se evaluó el efecto directo que tiene TSH con la dosis de 10mUI/mL.

8. DISCUSIÓN

La obesidad es una enfermedad en la cual intervienen muchos factores, dónde interactúa tanto la genética como el medio ambiente. Actualmente, la vida cotidiana ha sufrido diferentes cambios en la forma de alimentación como son el aumento en la ingesta de alimentos hipercalóricos altos en grasas y azúcares, además de una reducción en la actividad física diaria; esto ha tenido como consecuencia que el sobrepeso y la obesidad sean un problema cada vez más común en la población mundial (OMS, 2016).

Desde hace varios años se ha descrito el posible papel que podría jugar tanto la hormona estimulante de tiroides como su receptor (TSHR) en la génesis de la obesidad, y hace algunos años ha tomado gran relevancia su participación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos involucrados a nivel vascular, por lo que en este trabajo se evaluó la presencia de este receptor en el PVAT y las implicaciones que podría tener sobre procesos inflamatorios relacionados con la obesidad y la regulación del tono vascular.

En este trabajo se ha evaluado la presencia del TSHR en el tejido adiposo perivascular, empleando como modelos de obesidad la Dieta de Cafetería y la administración de fructosa al 10%. El primer grupo (dieta CAF) se estudió en condiciones que tratan de simular la obesidad humana inducida por productos comerciales los cuales en su mayoría son altos en grasa y azúcar, así como hipercalóricos, en comparación con el alimento estándar. Ya que se ha observado que el proceso de modernización y reestructuración socioeconómica en los países desarrollados y en vías de desarrollo, ha expuesto a la población al consumo de alimentos muy refinados, bebidas azucaradas, carne y productos lácteos que contienen altos niveles de grasas saturadas, y junto con la disminución del gasto energético, están contribuyendo al incremento en la prevalencia de

la obesidad en el mundo (Heitmann et al., 2009). Este tipo de dieta se ha denominado "dieta de cafetería" (CAF), y ha tenido éxito en la generación de la obesidad en modelos murinos, produciendo hiperfagia, aumento significativo en el peso corporal, inflamación en el hígado y el tejido adiposo blanco y marrón, hiperinsulinemia grave, hiperglucemia e intolerancia a la glucosa (Sampey et al. 2011a; Zeeni et al. 2015a). En este modelo, a los animales se les permite el libre acceso al alimento estándar y al agua, mientras se ofrecen alimentos humanos altamente apetecibles y energéticamente densos a voluntad. Este tipo de dieta promueve hiperfagia voluntaria que resulta en un rápido aumento de peso, aumento de la masa de grasa y se han descrito algunos parámetros bioquímicos alterados (Sampey et al. 2011b).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la dieta CAF es un modelo adecuado para inducir obesidad; entre los cambios más característicos se observó la ganancia de peso corporal en comparación a los otros dos grupos (Figura 1). Estos cambios fueron más notorios a partir de la semana 7 de acuerdo con la información que existe sobre este modelo de obesidad (Shafat, Murray, and Rumsey 2009; Sampey et al. 2011a). Se detectó un aumento general en el consumo de calorías, carbohidratos y grasa en el grupo CAF con respecto al control (Figura 2 a 4). Por otro lado, hubo un descenso en el consumo de proteína (Figura 5) y en el consumo diario de agua, concluyendo que este tipo de dieta alta en grasa e hipercalóricos conduce a un aumento en la ingesta de energía, provocando obesidad confirmando lo ya reportado previamente para este tipo de dietas por otros autores (Sampey et al. 2011a).

Con respecto a la dieta de fructosa al 10% se utilizó como un segundo modelo para inducir obesidad, sin embargo, el aumento en el peso corporal fue muy similar al del grupo control. La falta de ganancia de peso pudo deberse a la baja concentración de fructosa en el agua que

utilizaos, ya que otros modelos han reportado que para producir obesidad se utilizan concentraciones hasta del 50% de fructosa (Dornas et al. 2015). El consumo de fructosa se ha relacionado con el aumento de masa grasa en ratas obesas, por lo que en nuestros resultados a pesar de no haber encontrado un aumento en el peso corporal si observamos un incremento en la adiposidad de las ratas en el grupo de fructosa como ya se ha observado en otros trabajos (Dornas et al. 2015) . Debido a que el consumo de alimento y agua es variable en cada rata, las mediciones precisas del consumo energético son necesarias para comprender las causas y las consecuencias de la sobrealimentación en los diferentes tipos de dieta. Los datos presentados sugieren que la dieta CAF, que se caracteriza por una alta densidad energética, estimula el consumo de alimento y, por lo tanto, el aumento de peso de una manera más rápida y eficaz.

Debido a que se ha observado que la obesidad puede producir un aumento en los niveles de TSH (Sanyal and Raychaudhuri 2016) evaluamos si las dietas utilizadas en este trabajo provocaban cambios en las concentraciones séricas de TSH (Figura 6). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron significativos. Aunque hubo ratas que estuvieron fuera del rango de normalidad en ambos grupos, no se observó una correlación significativa entre el peso corporal y los niveles de TSH (datos no mostrados), por lo que es necesario ampliar la “n” para afirmar que los niveles altos en TSH tienen una correlación positiva con el peso corporal ya que sólo se observó una tendencia al aumento de las concentraciones de TSH. Es importante mencionar que la dieta de cafetería provoco un aumento de TSH en 42% de los animales. Datos que son similares a la prevalencia de hipotioridismo subclínico en pacientes con obesidad extrema, la cual es alrededor de 48.5% de acuerdo con el trabajo publicado por Gómez- Zamudio y cols., donde además encuentran una correlación entre el IMC y los niveles de TSH (Gómez-Zamudio et al. 2017).

Existen varios reportes donde encuentran una relación entre la obesidad y el aumento en los niveles de TSH en humano (Soriguer et al. 2011; Sanyal and Raychaudhuri 2016; Calvo Rico et al. 2010). A pesar de ello, el mecanismo por el cual se presenta este fenómeno no está del todo claro, por lo que se han propuesto diferentes teorías que tratan de explicar la alteración de los niveles de TSH en la obesidad dentro de las cuales destacan las siguientes:

a) Aumento en los niveles plasmáticos de leptina, la cual estimula la transcripción de pro-TRH y como consecuencia la producción de TRH y TSH. Además, estimula la actividad de desyodinasas provocando un desequilibrio en las hormonas tiroideas. En este sentido al no encontrar un aumento significativo en la expresión de leptina tampoco lo hubo en TSH.

b) Presencia de un proceso inflamatorio de bajo grado donde hay una producción de citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, IL-1, IL-6 las cuales afectan la captación de yodo, sin embargo, al no encontrar un aumento en estas citocinas no hubo un aumento de la hormona.

c) El aumento de TSH y T3 se considera un mecanismo compensatorio para contrarrestar la falta de respuesta de otros tejidos a las hormonas tiroideas. Debido a que el tiempo de exposición a la dieta CAF fue únicamente de 15 semanas este mecanismo probablemente aún no estaba activo. Por lo tanto, es necesario evaluar un tiempo más prolongado de la dieta.

Una de las principales aportaciones de este trabajo fue la demostración de la presencia del receptor a tirotrópina (TSHR) en el tejido adiposo perivascular ya que en la literatura solamente se describe la presencia del receptor en el tejido adiposo blanco de ratones (Regard, Sato, and Coughlin 2008a). Por lo que en este trabajo, se utilizaron diferentes tejidos en los que ya se había reportado la presencia del TSHR, como controles positivos para comparar su expresión

con el PVAT y se encontró que el tejido que mostró una mayor expresión del receptor fue el tejido adiposo blanco (epididimal, retroperitoneal y subcutáneo), seguido del Tejido Adiposo Perivascular, Cerebro, Aorta y por último Tiroides (Figura 7). Estos datos concuerdan con lo reportado por Regard y colaboradores (2008), donde el tejido adiposo blanco es el que tiene una mayor expresión del TSHR, incluso mayor que en tiroides. Sin embargo, la expresión del receptor reportada en tiroides por nuestro trabajo fue mucho menor, posiblemente esas diferencias sean debidas a la especie estudiada (ratón y rata).

Una vez que fue determinada la presencia del TSHR en el PVAT se evaluó si había cambios en su expresión producidos por la obesidad. Se encontró que en la obesidad inducida por dieta CAF, no se observaron cambios en la expresión del receptor en el tejido adiposo periaórtico (Figura 8). En relación con los cambios en la expresión del TSHR producidos por la obesidad, en el trabajo de Nannipieri y col., observan que en pacientes con obesidad severa la expresión del TSHR en tejido adiposo visceral y subcutáneo disminuye (Nannipieri et al. 2009). Esta discrepancia reportada anteriormente puede deberse a que en el trabajo de Nannipieri et al., evalúan solamente al tejido adiposo visceral y subcutáneo a diferencia del presente trabajo, en el cual se determinó la expresión del receptor en el PVAT tratándose de un tejido adiposo histológicamente y funcionalmente distinto.

Considerando que la mayoría de los vasos sanguíneos están rodeados por tejido adiposo y estos se encuentran en contacto directo, se quiso estudiar el comportamiento de la expresión del TSHR en la aorta. Como se muestra en la Figura 9, los grupos de dieta CAF y fructosa tuvieron niveles menores de expresión de TSHR en la aorta con respecto al control. Esta disminución podría estar relacionada con los efectos que estaría causando la hormona tirotrópica al estimular a su

receptor; ya que se ha puesto un mayor énfasis en el estudio de los efectos de esta hormona como un posible mediador de la inflamación por su capacidad de inducir la liberación de citocinas proinflamatorias.

Además del almacenamiento y la liberación de energía, el tejido adiposo libera una variedad de citocinas (adipocinas) con efectos fisiológicos de amplio alcance, que incluyen el apetito, el gasto de energía, la sensibilidad a la insulina y la coagulación. La desregulación en la producción de adipocinas se asocia con un estado proaterogénico y proinflamatorio. El tejido adiposo constituye una fuente importante de IL-6 circulante. Esta citocina junto con TNF α han sido identificadas como un factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (Antunes et al. 2008). Al respecto, se ha descrito que pacientes con niveles elevados de TSH muestran un aumento en la concentración plasmática de citocinas proinflamatorias (Eke et al., 2013; Yaturu et al., 2004). Así como una correlación positiva entre el aumento de marcadores de riesgo cardiovascular con los niveles séricos de TSH (Gómez-Zamudio et al. 2017).

En relación con estas citocinas proinflamatorias, se evaluó la expresión de TNF α , IL-1B, Adiponectina, Leptina y MCP-1 y los cambios que pudieran estar asociados con la obesidad causada por dieta CAF a las 15 semanas (Figura 10 a 14). Al respecto, se observó que no hubo diferencias significativas respecto al grupo control. Estos resultados probablemente se deben a que la especie estudiada (rata) presenta una mayor resistencia para generar un estado proinflamatorio más severo comparado al que ha sido reportado en otras especies como el ratón (Zeeni et al. 2015b).

Por este motivo se determinó si la estimulación directa con TSH (10mUI/mL y 100mUI/mL) era capaz de producir un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF α e IL-6) en los tejidos de aorta y PVAT a diferentes tiempos de incubación. Con respecto a la aorta, se observó que el punto máximo de liberación de citocinas se dió a las 6 horas después de la incubación con TSH, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y CAF. Es necesario evaluar concentraciones más bajas de TSH para comprobar si esta producción de citocinas se mantiene igual o menor en la aorta del grupo control; el cual podría no presentar síntesis de citocinas debido a que son dosis menos efectivas para presentar un estado inflamatorio.

Para determinar el tiempo de incubación y la concentración adecuada de TSH para el PVAT, se utilizaron 4 tiempos de incubación (1, 3, 6 y 24 horas) con ambas concentraciones de TSH (10 y 100 mUI/mL), y se cuantificaron las concentraciones de las citocinas TNF α e IL-6. Al comparar ambas dosis se observó que la mayor respuesta de síntesis en ambas citocinas era a las 6 horas de incubación. La dosis más alta presentó un aumento significativo con respecto a la más baja la cual no mostró un aumento en la síntesis de IL-6 y TNF α a lo largo de 24 horas. Por este motivo, se decidió enfocar la síntesis de ambas citocinas a las 6 horas con la concentración más alta (100mUI/mL) para comparar el grupo control y el grupo CAF en ambas dosis. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Antunes y col., los cuales describen que en cultivos primarios de adipocitos humanos un aumento de IL-6 a las 4 horas de incubación con TSH (50mUI/mL) (Antunes et al. 2008).

Por otra parte, se utilizó una concentración más alta (100mUI/mL) para estimular el PVAT de ambos grupos. En esta dosis se observa que el grupo CAF no presenta respuesta en ninguno

de los tiempos en comparación con los controles los cuales mostraron un aumento significativo a las 6 horas con respecto al grupo CAF (Figura 19). Esto podría deberse a que el grupo CAF presenta un posible desarrollo de estado inflamatorio y aumento en la adipogénesis causado por la obesidad inducida por este tipo de dieta. Esta característica de la obesidad podría estar impidiendo una respuesta hacia una concentración tan alta de TSH causando una ausencia de la respuesta de los receptores. Por el contrario, el grupo control presentó una mayor respuesta a los estímulos con TSH. Estos resultados apoyan la teoría que TSH también puede desencadenar una respuesta adipocítica proinflamatoria como ya se ha descrito en otros estudios (Antunes et al. 2008). Además, se han observado niveles séricos elevados de IL-6 y TNF α , así como una alteración de la fisiología endotelial en pacientes expuestos a niveles elevados de TSH, sin embargo, falta dilucidar el efecto de TSH sobre la obesidad crónica (Antunes et al. 2006). Aprender más sobre el mecanismo por el cual la TSH actúa sobre los adipocitos puede ampliar nuestra comprensión de la inflamación y las enfermedades cardiovasculares en el hipotiroidismo subclínico.

Recientemente, se describió la presencia del TSHR en células endoteliales (HUVEC) y su activación produce disminución en la expresión de los factores relajantes óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), mientras que aumenta el factor contráctil endotelina 1 y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1), de manera similar a como ocurre en la disfunción endotelial (Tian et al. 2014b) . Para determinar el posible papel de la TSH sobre el PVAT, se evaluaron los cambios en la contracción producida por fenilefrina sobre anillos con y sin PVAT de ratas controles. Se encontró que en los anillos con PVAT incubados con TSH (10 mUI/mL) hubo una disminución en la contracción a fenilefrina, que no se observó en los anillos sin PVAT (Figura 21 y

22). Estos resultados sugieren que la incubación con TSH podría estar aumentando el efecto anticontráctil del PVAT posiblemente por la producción de factores relajantes producidos en el PVAT de acuerdo a lo descrito previamente por Gil-Ortega y col. que encuentran que en condiciones normales el PVAT regula la contracción, debido a la producción de factores relajantes como el óxido nítrico, la prostaciclina y leptina (Gil-Ortega et al. 2009). Por otra parte, Sellitti y col., encontraron que la incubación con TSH podría producir relajación debido a que observaron un aumento en la síntesis de AMPc en células musculares humanas (Sellitti et al. 2000). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Napoli y col., donde describen que TSH tiene un efecto vasodilatador en pacientes humanos, pero este efecto es mediado por el endotelio (Napoli et al. 2009). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para dilucidar el efecto de TSH en las diferentes capas del lecho vascular, especialmente en las células musculares, ya que cuando incubamos las arterias con TSH observamos que bajo ciertas condiciones el estímulo con TSH podía producir un efecto contráctil directo sobre la arteria. Por esta razón, se realizó una curva concentración-respuesta a TSH (0.1, 1 y 10mUI/mL) y encontramos que en la concentración de 10 mUI/mL produjo contracción principalmente en los anillos que no tenían PVAT. Sugiriendo que el PVAT y, en menor medida el endotelio, están regulando la contracción causada por TSH en el músculo liso vascular. Estos resultados son interesantes ya que no se ha reportado un efecto contráctil por TSH. Sin embargo, estos resultados podrían parecer contradictorios a los reportados anteriormente por Sellitti y cols., aunque estos investigadores también reportan que el aumento en la producción de AMPc que observaron en células humanas incubadas con TSH, no se observa en células musculares obtenidas de rata, sugiriendo diferencias debidas a la especie estudiada (Sellitti et al. 2000). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que la TSH

puede estar actuando de manera diferencial en las diferentes tnicas arteriales. Por un lado, podra estar activando la liberación de factores relajantes en el endotelio, pero principalmente en el PVAT; mientras que en células musculares está produciendo contracción. Sera interesante identificar si estos efectos de TSH se mantienen o cambian durante la obesidad ya que esta parte no pudo determinarse.

9. CONCLUSIONES

- La Dieta de Cafetería genera un modelo de obesidad característico por el incremento significativo del peso corporal, sin embargo, no encontramos cambios importantes en los parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol, triglicéridos y HDL).
- No se observaron cambios en la expresión de TNF α , IL-1B, adiponectina, leptina y MCP-1 en el PVAT en la obesidad inducida por dieta de cafetería.
- Se identificó la expresión de TSHR en el PVAT y su expresión se comportó de manera distinta en cada tejido. El tejido adiposo blanco, el PVAT y la aorta mostraron mayor expresión del TSHR con respecto a la tiroides.
- La incubación de PVAT y aorta con TSH promovió un aumento significativo en la síntesis de TNF α e IL-6 del grupo control con respecto al grupo de dieta de CAF.
- La incubación con TSH de los anillos aórticos con PVAT causó una disminución significativa en la respuesta contráctil a fenilefrina.
- El estímulo con TSH (10mUI/mL) sobre anillos de arteria libres de PVAT del grupo control, produjo una respuesta vasoconstrictora directa.
- TSH actúa de manera diferencial en las diferentes tunicas arteriales, posiblemente liberando factores relajantes en PVAT y el endotelio, y contracción sobre el musculo liso.

11. REFERENCIAS.

- Antunes, T. T., A. Gagnon, B. Chen, F. Pacini, T. J. Smith, and A. Sorisky. 2006. 'Interleukin-6 release from human abdominal adipose cells is regulated by thyroid-stimulating hormone: effect of adipocyte differentiation and anatomic depot', *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 290: E1140.
- Antunes, Tayze T., AnneMarie Gagnon, Melanie L. Langille, and Alexander Sorisky. 2008. 'Thyroid-Stimulating Hormone Induces Interleukin-6 Release from Human Adipocytes through Activation of the Nuclear Factor- κ B Pathway', *Endocrinology*, 149: 3062-66.
- Arterburn, David, and Polly Hitchcock Noël. 2001. 'Obesity', *BMJ : British Medical Journal*, 322: 1406-09.
- Bell, A., A. Gagnon, L. Grunder, S. J. Parikh, T. J. Smith, and A. Sorisky. 2000. 'Functional TSH receptor in human abdominal preadipocytes and orbital fibroblasts', *Am J Physiol Cell Physiol*, 279: C335-40.
- Calvo Rico, Raúl, Estrella Gallego Fernández, M^a Luisa Lozano Placer, Olimpio Navarro Agudo, Josefa Páramo Rosel, and Francisco López de Castro. 2010. 'Hipotiroidismo Subclínico en Pacientes con Obesidad y Sobrepeso', *Revista Clínica de Medicina de Familia*, 3: 158-62.
- Chatterjee, Tapan K, Bruce J Aronow, Wilson S Tong, David Manka, Yaoliang Tang, Vladimir Y Bogdanov, Dusten Unruh, Andra L Blomkalns, Mark G Piegore, Daniel S Weintraub, Steven M Rudich, David G Kuhel, David Y Hui, and Neal L Weintraub. 2013. 'Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis', *Physiol Genomics*, 45: 697-709.
- Chatterjee, Tapan K, Lynn L Stoll, Gerene M Denning, Allan Harrelson, Andra L Blomkalns, Gila Idelman, Florence G Rothenberg, Bonnie Neltner, Sara A Romig-Martin, Eric W Dickson, Steven Rudich, and Neal L Weintraub. 2009. 'Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding', *Circ Res*, 104: 541-9.
- Dahl, Maria, Johanne Dam Ohrt, Cilius Esmann Fonvig, Julie Tonsgaard Kloppenborg, Oluf Pedersen, Torben Hansen, and Jens-Christian Holm. 2017. 'Subclinical Hypothyroidism in Danish Lean and Obese Children and Adolescents', *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 9: 8-16.
- de Heredia, Fátima Pérez, Sonia Gómez-Martínez, and Ascensión Marcos. 2012. 'Obesity, inflammation and the immune system', *Proceedings of the Nutrition Society*, 71: 332-38.
- Dornas, Waleska C., Wanderson G. de Lima, Maria L. Pedrosa, and Marcelo E. Silva. 2015. 'Health Implications of High-Fructose Intake and Current Research', *Advances in Nutrition*, 6: 729-37.
- Engeli, Stefan, Jürgen Janke, Kerstin Gorzelniak, Jana Böhnke, Nila Ghose, Carsten Lindschau, Friedrich C. Luft, and Arya M. Sharma. 2004. 'Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue', *Journal of Lipid Research*, 45: 1640-48.
- Eringa, Etto C, Wineke Bakker, and Victor W M van Hinsbergh. 2012. 'Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue', *Vascul Pharmacol*, 56: 204-9.
- Fésüs, Gábor, Galyna Dubrovskaya, Kerstin Gorzelniak, Reinhart Kluge, Yu Huang, Friedrich C. Luft, and Maik Gollasch. 2007. 'Adiponectin is a novel humoral vasodilator', *Cardiovascular Research*, 75: 719-27.
- Gaggini, Melania, Fabrizia Carli, and Amalia Gastaldelli. 2017. "The color of fat and its central role in the development and progression of metabolic diseases." In *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*.
- Gálvez-Prieto, B., J. Bolbrinker, P. Stucchi, A. I. de las Heras, B. Merino, S. Arribas, M. Ruiz-Gayo, M. Huber, M. Wehland, R. Kreutz, and M. S. Fernandez-Alfonso. 2008. 'Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue', *Journal of Endocrinology*, 197: 55-64.

- Ghigliotti, Giorgio, Chiara Barisione, Silvano Garibaldi, Patrizia Fabbi, Claudio Brunelli, Paolo Spallarossa, Paola Altieri, Gianmarco Rosa, Giovanni Spinella, Domenico Palombo, Razvan Arsenescu, and Violeta Arsenescu. 2014. 'Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions', *Inflammation*, 37: 1337-53.
- Gil-Ortega, Marta, Beatriz Gálvez-Prieto, María S. Fernández-Alfonso, and Beatriz Somoza. 2008. 'Papel del tejido adiposo perivascular en la función vascular', *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 29: 71-77.
- . 2009. 'Papel del tejido adiposo perivascular en la función vascular', *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 21: 71-77.
- Godo, Shigeo, and Hiroaki Shimokawa. 2017. 'Endothelial Functions', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37: e108.
- Gómez-Zamudio, Jaime Héctor, Victoria Mendoza-Zubieta, Aldo Ferreira-Hermosillo, Marío Antonio Molina-Ayala, Adán Valladares-Sálgado, Fernando Suárez-Sánchez, Jose De Jesús Peralta-Romero, and Miguel Cruz. 2017. 'Response: High Thyroid-stimulating Hormone Levels Increase Proinflammatory and Cardiovascular Markers in Patients with Extreme Obesity', *Archives of Medical Research*, 48: 217.
- Gutch, Manish, Sumit Rungta, Sukriti Kumar, Avinash Agarwal, Annessh Bhattacharya, and Syed Mohd Razi. 2017. 'Thyroid functions and serum lipid profile in metabolic syndrome', *Biomedical Journal*, 40: 147-53.
- Haraguchi, K., H. Shimura, L. Lin, T. Endo, and T. Onaya. 1996. 'Differentiation of rat preadipocytes is accompanied by expression of thyrotropin receptors', *Endocrinology*, 137: 3200-5.
- Haslam, David W, and W Philip T James. 2005. 'Obesity', *Lancet*, 366: 1197-209.
- Hermsdorff, Helen Hermana M., M. Ángeles Zulet, Blanca Puchau, and J. Alfredo Martínez. 2011. 'Central Adiposity Rather Than Total Adiposity Measurements Are Specifically Involved in the Inflammatory Status from Healthy Young Adults', *Inflammation*, 34: 161-70.
- Kattoor, Ajo John, Naga Venkata K. Pothineni, Deepak Palagiri, and Jawahar L. Mehta. 2017. 'Oxidative Stress in Atherosclerosis', *Current Atherosclerosis Reports*, 19: 42.
- Koerner, Antje, Jürgen Kratzsch, and Wieland Kiess. 2005. 'Adipocytokines: leptin—the classical, resistin—the controversial, adiponectin—the promising, and more to come', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 19: 525-46.
- Krause, A. J., B. Cines, E. Pogrebniak, R. Sherafat-Kazemzadeh, A. P. Demidowich, O. A. Galescu, S. M. Brady, J. C. Reynolds, V. S. Hubbard, and J. A. Yanovski. 2016. 'Associations between adiposity and indicators of thyroid status in children and adolescents', *Pediatric Obesity*, 11: 551-58.
- Lapice, Emanuela, Simona Maione, Lidia Patti, Paola Cipriano, Angela A. Rivellese, Gabriele Riccardi, and Olga Vaccaro. 2009. 'Abdominal Adiposity Is Associated With Elevated C-Reactive Protein Independent of BMI in Healthy Nonobese People', *Diabetes Care*, 32: 1734-36.
- Lembo, G., C. Vecchione, L. Fratta, G. Marino, V. Trimarco, G. Amati, and B. Trimarco. 2000. 'Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms', *Diabetes*, 49: 293.
- Löhn, Matthias, Galyna Dubrovskaya, Birgit Lauterbach, Friedrich C Luft, Maik Gollasch, and Arya M Sharma. 2002. 'Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor', *FASEB J*, 16: 1057-63.
- Lu, S., Q. Guan, Y. Liu, H. Wang, W. Xu, X. Li, Y. Fu, L. Gao, J. Zhao, and X. Wang. 2012. 'Role of extrathyroidal TSHR expression in adipocyte differentiation and its association with obesity', *Lipids Health Dis*, 11: 17.
- Lynch, Fiona M, Sarah B Withers, Zhihong Yao, Matthias E Werner, Gill Edwards, Arthur H Weston, and Anthony M Heagerty. 2013. 'Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BK(Ca) channels to induce anticontractile responses', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 304: H786-95.
- Manzur, Fernando; Alvear, Ciro; Alayón, Alicia. 2010. 'Adipocytes, visceral obesity, inflammation and cardiovascular disease', *Revista Colombiana de Cardiología*.

- Michalaki, M. A., A. G. Vagenakis, A. S. Leonardou, M. N. Argentou, I. G. Habeos, M. G. Makri, A. I. Psyrogiannis, F. E. Kalfarentzos, and V. E. Kyriazopoulou. 2006. 'Thyroid function in humans with morbid obesity', *Thyroid*, 16: 73-8.
- Nannipieri, M., F. Cecchetti, M. Anselmino, S. Camastra, P. Niccolini, M. Lamacchia, M. Rossi, G. Iervasi, and E. Ferrannini. 2009. 'Expression of thyrotropin and thyroid hormone receptors in adipose tissue of patients with morbid obesity and/or type 2 diabetes: effects of weight loss', *Int J Obes*, 33: 1001-06.
- Napoli, Raffaele, Valentina Apuzzi, Giorgio Bosso, Carolina D'Anna, Antonietta De Sena, Concetta Pirozzi, Aldo Marano, Gelsy Arianna Lupoli, Giuseppe Cudemo, Ugo Oliviero, Margherita Matarazzo, Giovanni Lupoli, and Luigi Saccá. 2009. 'Recombinant Human Thyrotropin Enhances Endothelial-Mediated Vasodilation of Conduit Arteries', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94: 1012-16.
- Nishimura, S., I. Manabe, and R. Nagai. 2009. 'Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome', *Discov Med*, 8: 55-60.
- Omar, A., T. K. Chatterjee, Y. Tang, D. Y. Hui, and N. L. Weintraub. 2014. 'Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 1631-6.
- Pearce, E. N. 2012. 'Thyroid hormone and obesity', *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 19: 408-13.
- Rai, S., J. A. Kumar, P. K. S. K. Shetty, T. Rai, Shrinidhi, M. Begum, and Shashikala. 2013. 'Thyroid function in type 2 diabetes mellitus and in diabetic nephropathy', *J Clin Diagn Res*, 7: 1583-5.
- Regard, J. B., I. T. Sato, and S. R. Coughlin. 2008a. 'Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression', *Cell*, 135: 561-71.
- Regard, Jean B., Isaac T. Sato, and Shaun R. Coughlin. 2008b. 'Anatomical profiling of G protein-coupled receptor expression', *Cell*, 135: 561-71.
- Reinehr, T. 2010. 'Obesity and thyroid function', *Mol Cell Endocrinol*, 316: 165-71.
- Rittig, K., J. H. Dolderer, B. Balletshofer, J. Machann, F. Schick, T. Meile, M. Küper, U. A. Stock, H. Staiger, F. Machicao, H.-E. Schaller, A. Königsrainer, H.-U. Häring, and D. I. Siegel-Axel. 2012. 'The secretion pattern of perivascular fat cells is different from that of subcutaneous and visceral fat cells', *Diabetologia*, 55: 1514-25.
- Sampey, B. P., A. M. Vanhoose, H. M. Winfield, A. J. Freemerman, M. J. Muehlbauer, P. T. Fueger, C. B. Newgard, and L. Makowski. 2011a. 'Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet', *Obesity (Silver Spring)*, 19: 1109-17.
- Sampey, Brante P., Amanda M. Vanhoose, Helena M. Winfield, Alex J. Freemerman, Michael J. Muehlbauer, Patrick T. Fueger, Christopher B. Newgard, and Liza Makowski. 2011b. 'Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 19: 1109-17.
- Sanyal, Debmalya, and Moutusi Raychaudhuri. 2016. 'Hypothyroidism and obesity: An intriguing link', *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20: 554-57.
- Sellitti, Donald F., David Dennison, Takashi Akamizu, Sonia Q. Doi, Leonard D. Kohn, and Hiroyuki Koshiyama. 2000. 'Thyrotropin Regulation of Cyclic Adenosine Monophosphate Production in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells', *Thyroid*, 10: 219-25.
- Shafat, A., B. Murray, and D. Rumsey. 2009. 'Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat', *Appetite*, 52: 34-8.
- Soriguer, Federico, Sergio Valdes, Sonsoles Morcillo, Isabel Esteve, Maria C. Almaraz, Maria S. R. de Adana, Maria J. Tapia, Marta Dominguez, Carolina Gutierrez-Repiso, Elehazara Rubio-Martin, Lourdes Garrido-Sanchez, Vidal Perez, Maria J. Garriga, Gemma Rojo-Martinez, and Eduardo Garcia-Fuentes. 2011. 'Thyroid hormone levels predict the change in body weight: a prospective study', *European Journal of Clinical Investigation*, 41: 1202-09.

- Teixeira, Deborah, Ana Lucia Cecconello, Wania Aparecida Partata, Luciano Stürmer de Fraga, Maria Flávia Marques Ribeiro, and Renata Padilha Guedes. 2017. 'The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent', *Nutritional Neuroscience*: 1-11.
- Tian, L., L. Zhang, J. Liu, T. Guo, C. Gao, and J. Ni. 2014a. 'Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells', *J Mol Endocrinol*, 52: 215-22.
- Tian, Limin, Luyan Zhang, Jing Liu, Tiankang Guo, Cuixia Gao, and Jing Ni. 2014b. 'Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells', *Journal of Molecular Endocrinology*, 52: 215-22.
- Tilg, Herbert, and Alexander R. Moschen. 2006. 'Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity', *Nat Rev Immunol*, 6: 772-83.
- Vecchione, Carmine, Angelo Maffei, Salvatore Colella, Alessandra Aretini, Roberta Poulet, Giacomo Frati, Maria Teresa Gentile, Luigi Fratta, Valentina Trimarco, Bruno Trimarco, and Giuseppe Lembo. 2002. 'Leptin Effect on Endothelial Nitric Oxide Is Mediated Through Akt–Endothelial Nitric Oxide Synthase Phosphorylation Pathway', *Diabetes*, 51: 168.
- Zeeni, N., C. Dagher-Hamalian, H. Dimassi, and W. H. Faour. 2015a. 'Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation', *Inflamm Res*, 64: 501-12.
- Zeeni, Nadine, Carole Dagher-Hamalian, Hani Dimassi, and Wissam H. Faour. 2015b. 'Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation', *Inflammation Research*, 64: 501-12.
- Zhang, L., G. Baker, D. Janus, C. A. Paddon, D. Fuhrer, and M. Ludgate. 2006. 'Biological effects of thyrotropin receptor activation on human orbital preadipocytes', *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47: 5197-203.
- Zhang, W., L. M. Tian, Y. Han, H. Y. Ma, L. C. Wang, J. Guo, L. Gao, and J. J. Zhao. 2009. 'Presence of thyrotropin receptor in hepatocytes: not a case of illegitimate transcription', *J Cell Mol Med*, 13: 4636-42.
- Hernández M, Rivera J, Shamah T, Cuevas L, Gómez LM, Gaona EB, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe final de resultados. México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2016.

10. ANEXOS

a) Estandarización de PCR-Tiempo Real.

La arteria Aorta y el tejido adiposo perivascular de la aorta se extrajeron de cada uno de los animales (grupo control, CAF y fructosa) y se homogenizó en 1mL del reactivo Tripure para posteriormente realizar la extracción de RNA total como se describe en la metodología. La integridad del RNA aislado se analizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En la figura A se presentan muestras representativas del RNA total aislado del PVAT. Se pueden apreciar las bandas correspondientes a los RNA's ribosomales 28S y 18S.

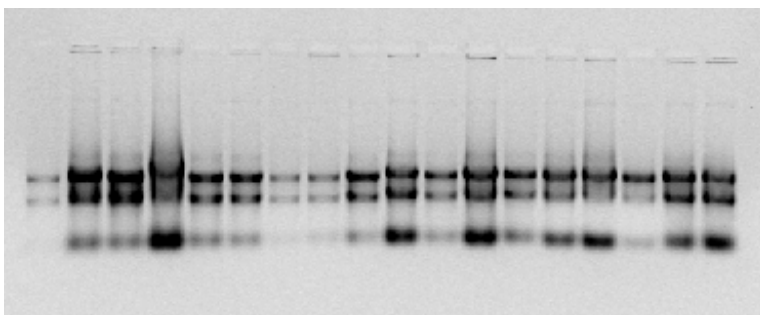


Figura A.- Integridad de RNA. Se presentan varias muestras representativas de RNA's aislados del PVAT y analizados en gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio.

A partir de los cDNA's sintetizados, se realizaron los estudios de PCR en tiempo real para observar la expresión de TSHR en el PVAT de los diferentes grupos (controles, fructosa y CAF). Como gen de referencia se utilizó el gen β -actina que codifica para una proteína ribosomal. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura B y C, en ella se logra apreciar que la amplificación de β -actina fue a los 15 ciclos y la amplificación de TSHR fue a los 25 ciclos; ambos experimentos en el PVAT.

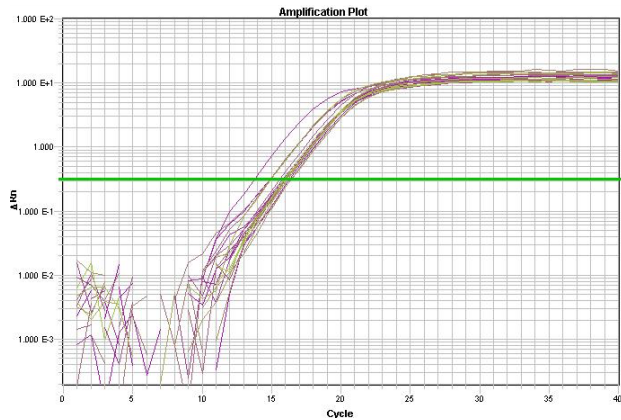


Figura B.- Amplificación para β -actina.
Se muestra la amplificación de β -actina en el PVAT.

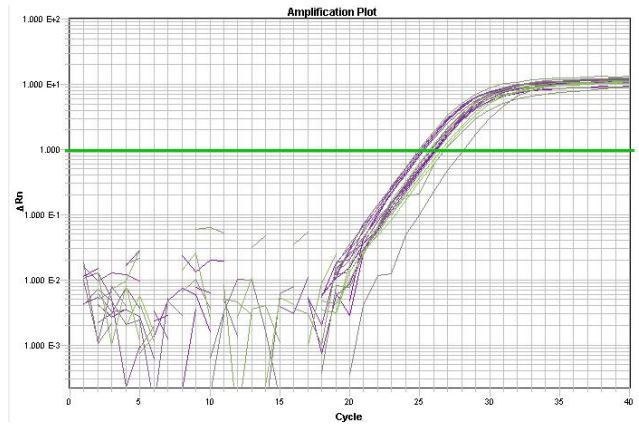


Figura C.- Amplificación para TSHR. Se muestra la amplificación de TSHR en el PVAT.

La especificidad de la reacción se evaluó por medio del análisis de la temperatura de disociación (melting). En el análisis melting se observó un solo pico para cada uno de los productos de amplificación con SYBR Green (Figura D y E).

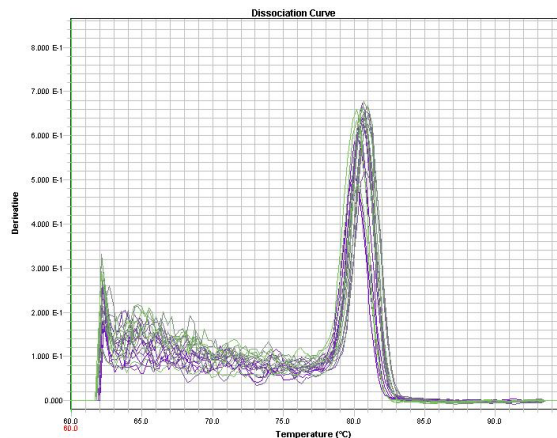


Figura D.- Curva de disociación para β -actina. Se muestra un solo pico de amplificación para β -actina en el PVAT.

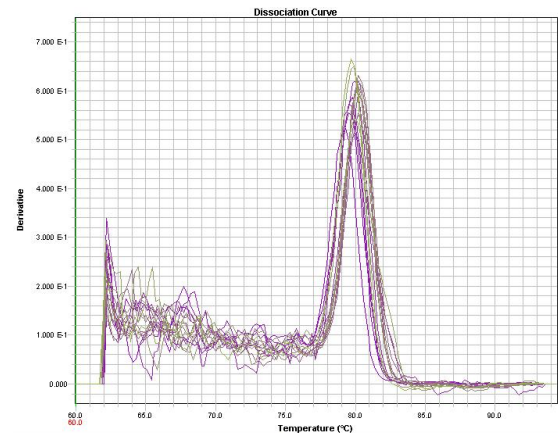


Figura E.- Curva de disociación para TSHR. Se muestra un solo pico de amplificación para TSHR en el PVAT.

b) Lista de Alimentos – Dieta CAF.

Tabla A.- Lista de Alimentos para Dieta de Cafetería. Se muestra el contenido energético de los alimentos consumidos por los animales del grupo CAF.

Tamaño de porción: 10 gramos	Calorias (kcal)	Grasa (g)	Sodio (g)	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)
MANTECADAS	41.9	2.3	0.0	4.5	0.6
CHETOS	52.0	3.0	0.1	5.7	0.5
BIMBUÑUELOS	38.2	1.8	0.0	5.5	0.0
DONAS	45.3	2.7	0.0	5.0	0.4
GALLETAS PRINCIPE	47.6	1.9	0.0	6.7	1.0
CHOCO ROLL	35.8	1.3	0.0	5.8	0.5
DELICIOSAS	41.3	1.3	0.0	6.7	0.7
CANELITAS	50.0	1.5	0.0	8.0	1.0
CHICHARRON	55.7	3.7	0.2	0.0	5.7
SUAVICREMAS	53.8	2.6	0.0	7.2	0.4
NAPOLITANAS	50.6	2.4	0.0	7.0	0.4
FRUITOOPS	37.7	0.3	0.0	8.3	0.7
DORADITAS	53.4	2.7	0.1	6.7	0.5
LORS	46.9	2.0	0.0	7.1	0.0
POLVORONES	47.8	2.1	0.0	6.9	0.5
DIETA ESTÁNDAR	32.3	1.7	0.0	5.7	2.7

c) Secuencia de Primers utilizados para PCR-Tiempo Real.

PRIMERS	FORWARD	REVERSE
B-Actina	CCTGAGCGCAAGTACTCTGTGT	GCTGATCCACATCTGCTGGAA
TSHR	GACCCACTTTGCTAGACGTG	GAGAGTCCAGGTGTTCTTCGC
Leptina	CCAGGATGACACCAAACCT	GATACCGACTGCGTGTGTGA
Adiponectina	CCAATGTTCCCATTCGCTT	TAGTAGAGCCCCGGAATGTT
TNF α	CTGCCTCTGGCTACAAGG	CTGTGCCTCAGGGAACAGTC
IL-1B	TATGTCTTGCCCGTGGAGCTT	GTCACAGAGGACGGGCTCTT
MCP-1	ATCCCAATGAGTAGGCTGG	CTCTTGAGCTTGGTGACAA



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00182

Matrícula: 2153803922

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE RECEPTORES A TIROTROPINA (TSHR) EN TEJIDO ADIPOSO PERIAÓRTICO Y SU PAPEL SOBRE LA VASCULATURA EN UN MODELO MURINO DE OBESIDAD.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 28 del mes de noviembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. GERARDO BLANCAS FLORES
- DR. ADAN VALLADARES SALGADO
- DRA. MARTHA LAZARO SUAREZ
- DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: LUIS EDUARDO VALDERRABANO FAJARDO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



LUIS EDUARDO VALDERRABANO FAJARDO

ALUMNO

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS
MARTINEZ

PRESIDENTE

DR. GERARDO BLANCAS FLORES

VOCAL

DR. ADAN VALLADARES SALGADO

VOCAL

DRA. MARTHA LAZARO SUAREZ

SECRETARIO

DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO