



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS:

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
HIPOTALÁMICOS IMPLICADOS EN LOS EFECTOS
DEL KAEMPFEROL SOBRE EL BALANCE
ENERGÉTICO EN RATONES OBESOS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA

Q.F.B. PEDRO ALBERTO ROMERO JUÁREZ

ASESOR: D.C. GERARDO VÁZQUEZ MARRUFO

CO-ASESOR: D.C. OMAR GUZMÁN QUEVEDO

Agosto 2023

DEDICATORIAS

Para mi esposa Noemi Esmeralda por todos los momentos sacrificados durante mis estudios y por todo el apoyo brindado, sin el cual este proyecto de vida no pudiera ser posible, gracias eternamente.

A mis hijos Lucas y Abel por darme la dicha de ser padre, son mi más grande motivación para mejorar como persona y como profesional.

A mis padres Pedro y Reynalda por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas, su paciencia y por siempre motivarme a seguir mis sueños.

A mis hermanos y abuelos por estar siempre acompañándome en cada proceso de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Al D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo, por su apoyo durante la realización de este trabajo, por todos sus acertados aportes que contribuyeron a mejorarlo significativamente. Gracias también por el fino acompañamiento en las formalidades durante el desarrollo de mis estudios. Le seré siempre grato.

Mis más profundos agradecimientos al D. en C. Omar Guzmán Quevedo por su valioso apoyo en la realización de la tesis. También a sus comentarios y sugerencias para mejorar significativamente el trabajo y crecer académicamente. Por sus consejos por los cuales he mejorado tanto académicamente como personalmente. Gracias por ser mi mentor.

Mi más sincero agradecimiento a la D. en C. María de la Luz Torner Aguilar, por permitirnos utilizar las instalaciones de su laboratorio para llevar a cabo los experimentos de esta tesis. Por todo el apoyo brindado, todos los consejos dados y toda la confianza brindada, un infinito agradecimiento por adoptarme en su laboratorio. Gracias a su generosidad, logramos completar nuestra investigación de manera efectiva y exitosa.

A mi comité tutorial, D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro, D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres y D. en C. María de la Luz Torner Aguilar, por su valioso tiempo y dedicación para evaluar y discutir este trabajo de tesis. Gracias a sus comentarios y sugerencias, basados en su *expertise*, se logró mejorar el trabajo.

A los estudiantes pertenecientes al Laboratorio de Neuronutrición Experimental e Ingeniería de alimentos del Tecnológico Nacional de México (TECNM) / Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro, a los estudiantes del Laboratorio de Neuroendocrinología del Estrés del Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán / IMSS y los compañeros del Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología / UMSNH gracias por sus consejos y su grata compañía en este hermoso proceso de aprendizaje. Espero seguir proyectando grandes logros con ustedes.

COMITÉ TUTORAL

Comité tutorial designado para el seguimiento y revisión de la tesis presentada por el
Químico Farmacobiólogo, Pedro Alberto Romero Juárez:

D. en C. José Miguel Cervantes Alfaro
Presidente

D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo
Vocal 1 (Director de Tesis)

D. en C. Omar Guzmán Quevedo
Vocal 2 (Co-director de Tesis)

D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres
Vocal 3

D. en C. María de la Luz Torner Aguilar
Vocal 4

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo pertenece al Sistema Nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).

El Q.F.B Pedro Alberto Romero Juárez, agradece al CONAHCYT la beca con número de registro: 793125, que le fue otorgada para la realización de sus estudios de Posgrado.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Neuroendocrinología de Estrés del Centro de Investigaciones Biomédicas de Michoacán, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S), liderado por la D.C. María de la Luz Torner Aguilar, así como en el Laboratorio de Neuronutrición Experimental e Ingeniería de Alimentos del Tecnológico Nacional de México (TECNM) / Instituto Tecnológico Superior de Tacámbaro, liderado por el D.C. Omar Guzmán Quevedo en colaboración con el Laboratorio de Conservación y Biotecnología Microbiana del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la Dirección del D.C. Gerardo Vázquez Marrufo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	3
1. Obesidad.....	3
1.1. <i>Definición y prevalencia de la obesidad</i>	3
1.2. <i>Relación de la obesidad con otras enfermedades</i>	4
2. Balance energético.....	5
2.1. <i>Regulación de la ingesta de alimento</i>	5
2.2. <i>Regulación del gasto energético</i>	7
2.3. <i>Regulación del balance energético y la actividad física</i>	7
2.3. <i>Regulación hipotalámica del BE</i>	7
2.3.1. <i>Vía intracelular del sistema de las melanocortinas en la regulación del BE</i>	8
2.3.2. <i>Vía intracelular del receptor TGR5 / DIO2 y su rol en el BE</i>	9
2.3.3. <i>Sistemas reguladores del balance energético en la obesidad</i>	11
3. Kaempferol.....	14
3.1. <i>Kaempferol y su rol en la regulación del metabolismo energético</i>	14
JUSTIFICACIÓN.....	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS.....	18
1. Objetivo general	18
2. Objetivos específicos.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
1. Animales.....	20
2. Inducción de un cuadro de obesidad	20

3. Determinación del efecto agudo de la administración central de KF sobre el BE	22
3.1. Neurocirugía para implantación de cánula i.c.v.....	22
3.2. Verificación del efecto de la administración de KF sobre el PC y el CA	22
4. Evaluación de la administración i.c.v de KF sobre la glucemia.....	23
4.1. Test de sensibilidad a la insulina	23
4.2. Concentración de glucosa en respuesta a la inyección i.c.v. de KF en ratones con 24 horas de ayuno	23
5. Efecto del tratamiento agudo i.c.v. con KF sobre la expresión génica de componentes de vías hipotálamicas reguladoras del BE.....	23
5.1. Obtención de tejido hipotálamico	23
5.2. Extracción de mRNA y retrotranscripción (RT).....	24
5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	24
6. Verificación del efecto del tratamiento central con KF sobre la actividad física, el estrés y la ansiedad	25
6.1. Prueba de campo abierto	25
6.2. Prueba de consumo de alimento en un ambiente novedoso	25
7. Análisis estadístico	26
RESULTADOS	27
1. Inducción de la obesidad	27
2. Verificación del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre el BE	28
2.1 Evaluación del tratamiento i.c.v. agudo con kaempferol sobre el PC	28
2.2 Evaluación del efecto agudo del tratamiento i.c.v. de kaempferol sobre el CA y la eficiencia alimentaria	29
3. Evaluación del efecto agudo de la administración i.c.v. de KF sobre la sensibilidad a la insulina y la glucemia.....	30
4. Análisis del efecto del tratamiento agudo i.c.v. con kaempferol sobre la expresión génica de marcadores de la regulación hipotálamica del BE.....	31
4.1. Análisis del efecto del tratamiento con kaempferol sobre la expresión génica del sistema de las melanocortinas en el hipotálamo	31
4.2. Análisis del efecto agudo del tratamiento con KF sobre la expresión génica de la vía TGR5 / DIO2 en el hipotálamo	31

5. Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre parámetros de actividad física, estrés y ansiedad	33
5.1. <i>Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre la actividad física</i>	33
5.2. <i>Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre el estrés y la ansiedad</i>	33
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS.	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalencia de la obesidad y su relación con otras enfermedades.....	05
Figura 2.	Regulación del balance energético.....	06
Figura 3.	Regulación hipotalámica del balance energético.....	11
Figura 4.	Dietas altas en grasas saturadas modifican el correcto funcionamiento de los sistemas reguladores del balance energético.....	13
Figura 5.	Distribución y propiedades del kaempferol.....	16
Figura 6.	Estrategia experimental.....	19
Figura 7.	Inducción de la obesidad.....	27
Figura 8.	Evaluación del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre el PC.....	28
Figura 9.	Efecto del tratamiento agudo i.c.v. con KF sobre el CA y la eficiencia alimentaria.....	29
Figura 10.	Evaluación del efecto agudo de la administración i.c.v. de KF sobre la sensibilidad a la insulina y la glucemia en ayuno.....	30
Figura 11.	Análisis del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre el sistema de las melanocortinas.....	31
Figura 12.	Análisis del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre la vía TGR5 / DIO2 en el hipotálamo.....	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Alimentos ofertados en la dieta para la inducción de obesidad.....	20
Tabla 2.	Aporte calórico y datos nutrimentales de los diferentes alimentos ofertados en la dieta CAF.....	21
Tabla 3.	Secuencias de los cebadores empleados para el análisis de expresión génica.....	25
Tablas 4.	Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre la actividad física en ratones obesos.....	33
Tabla 5.	Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre el estrés y la ansiedad en ratones obesos.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

α-MSH	Hormona estimulante de melanócitos
ARC	Núcleo arqueado
BAT	Tejido adiposo pardo
BE	Balance energético
CA	Consumo de alimento
CART	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
DIO2	Deiodinasa tipo II
GE	Gasto energético
HFD	Dieta rica en grasa
KF	Kaempferol
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
i.c.v	Intracerebroventricular
iNOS	Óxido nítrico sintasa
MCR	Receptor de melanocortina
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero
NPY	Neuropéptido Y
PC	Peso corporal
POMC	Proopiomelanocortina
PVH	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PYY	Péptido YY
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TGR5	Receptor Takeda 5 acoplado a proteínas G
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UCP1	Proteína de desacoplamiento mitocondrial 1
WAT	Tejido adiposo blanco
WHO	Organización mundial de la salud

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad afectan en el mundo a más de un tercio de la población, mientras que en México tres cuartas partes de la población lo padecen, haciendo de ello el principal problema de salud pública. Dicha afección se desarrolla por la ruptura del balance energético (BE), representado por el equilibrio entre el consumo de alimento (CA) y el gasto de calorías. La regulación del BE se lleva a cabo críticamente en el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo donde convergen vías de señalización encargadas de la regulación de la homeostasis energética en condiciones normales de peso, como lo es el sistema de las melanocortinas y el receptor Takeda 5 acoplado a proteínas G (TGR5) junto con la enzima deiodinasa tipo II (DIO2). Estas vías en la obesidad disminuyen su capacidad de responder a los estímulos metabólicos y regular el BE, promoviendo ganancia de peso corporal (PC). Dada la poca efectividad a largo plazo de las terapias contra la obesidad, el uso de compuestos de origen vegetal ha surgido como una estrategia para su mitigación. Entre estos, con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas e hipoglucemiantes, se encuentra el kaempferol (KF), un flavonoide altamente distribuido en vegetales y en algunos tipos de hongos. Sin embargo, poco se sabe sobre la relación de los efectos de KF y la regulación del metabolismo energético en el ARC. El objetivo de este trabajo fue analizar los mecanismos hipotalámicos implicados en los efectos del KF sobre BE en ratones obesos. Para tal objetivo, se utilizaron ratones macho adultos de la cepa C57BL/6J, los cuales fueron sometidos a una dieta de cafetería (CAF). Después, se evaluó el efecto agudo del tratamiento intracerebroventricular (i.c.v.) con KF sobre el PC y CA, los niveles de glucosa en sangre y la expresión génica de marcadores hipotalámicos de la regulación del BE. El tratamiento con una dosis de 5 µg de KF mostró una disminución significativa de la ganancia de PC, sin cambios en el CA y una reducción de la eficiencia alimentaria. Por otro lado, no se observó efecto sobre la sensibilidad a la insulina y las concentraciones de glucosa plasmática. No se observaron cambios de expresión del sistema de las melanocortinas, en cambio, se observó un aumento significativo en la expresión de los genes *Tgr5* y *Dio2*, asociado a un aumento de la actividad física. Los datos sugieren que el KF promueve un BE negativo y pérdida de peso a través de un incremento de la actividad hipotalámica de la vía intracelular TGR5/DIO2.

Palabras clave: Obesidad, Kaempferol, Balance energético, Vía de las melanocortinas, Receptor TGR5 y DIO2.

ABSTRACT

Overweight and obesity affect more than a third of the world population, while in Mexico three quarters of the population suffer from it, making it the main public health problem. This condition develops due to the breakdown of the energy balance (EB), which consists of the balance between energy intake and caloric expenditure. The regulation of BE is critically carried out in the arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus, where signaling pathways responsible for the regulation of energy homeostasis under normal weight conditions converge, such as the melanocortin system and the Takeda G-protein-coupled receptor 5 (TGR5) together with the enzyme deiodinase type II (DIO2). In obesity, these pathways decrease their ability to respond to metabolic stimuli and regulate energy balance, promoting body weight gain. Given the low long-term effectiveness of therapies against obesity, the use of compounds of plant origin has emerged as a strategy for its mitigation. Among these, with antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and hypoglycemic properties, is kaempferol (KF), a flavonoid highly distributed in vegetables and in some types of fungi. However, little is known about the relationship of the effects of KF and the regulation of energy metabolism in the ARC. The objective of this work was to analyze the hypothalamic mechanisms involved in the effects of KF on EB in obese mice. Thus, adult male mice of the C57BL/6J strain were used, which were subjected to a cafeteria diet (CAF). Once obese, the effect of acute intracerebroventricular (i.c.v.) treatment with KF on body weight and food intake, blood glucose levels, and gene expression of hypothalamic markers of EB regulation was evaluated. The central treatment with a 5µg dose of KF showed a significant decrease in body weight gain, no change in food intake, and reduced feed efficiency. On the other hand, no effect on insulin sensitivity and blood glucose levels was observed. The treatment did not modify the gene expression of the melanocortin system-linked neuropeptides; instead, a significant increase in the expression of the *Tgr5* and *Dio2* genes along with an increase in physical activity was observed. The data suggest that KF promotes a negative EB through an increase in hypothalamic activity of the intracellular TGR5/DIO2 pathway.

Keywords: Obesity, Kaempferol, Energy balance, Melanocortin pathway, TGR5 receptor, and DIO2.

INTRODUCCIÓN

La obesidad es definida como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (WHO, 2021). Actualmente más de un tercio de la población mundial es afectada por el sobrepeso y obesidad. De acuerdo con la Organización Mundial de la salud (WHO), más de 1900 millones de adultos y 340 millones de niños y adolescentes presentan esta enfermedad (WHO, 2021). Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT), en México, el 75% de la población adulta presenta sobrepeso u obesidad (ENSANUT, 2021). Dicha condición médica es más que un problema estético, pues está estrechamente relacionada con un alto riesgo cardiometabólico, algunos tipos de cáncer, pobre salud mental y sobre todo diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (WHO, 2021).

La obesidad está dada por un incremento en el peso corporal (PC), en su gran mayoría tejido graso, debido a un consumo superior de calorías comparado con el gasto de éstas (Keihani *et al.*, 2015). Esto se da como una consecuencia de la ruptura del balance energético (BE), el cual en condiciones normales de salud consiste de un equilibrio entre el consumo alimenticio (CA) y gasto energético (GE) (Baltasar, 2001). La regulación del BE se lleva a cabo en el cerebro, más en concreto, en el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo, donde se alojan dos poblaciones neuronales con funciones antagónicas, quienes favorecen o inhiben el CA y el GE (Schaeffer *et al.*, 2014). La regulación del BE es fuertemente alterada por el consumo de dietas hiperlipídicas (DHL), debido al efecto inflamatorio que promueven los ácidos saturados sobre el ARC (André *et al.*, 2017).

Por otro lado, existe en la literatura evidencia sólida sobre las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de compuestos de origen vegetal, asociadas a efectos metabólicos y neuroprotectores (Lacerda *et al.*, 2022). Sin embargo, poco se sabe de la relación de los efectos de estos compuestos y la regulación del metabolismo energético en el ARC. Un estudio previo realizado por nuestro equipo de trabajo mostró que el flavonoide kaempferol (KF), administrado crónicamente, reduce el estado inflamatorio del ARC de ratones obesos (Romero-Juárez *et al.*, 2021). El estudio mostró también que la administración por vía intracerebroventricular (i.c.v.) regula el BE, promoviendo una pérdida de PC (Romero-Juárez *et al.*, 2021). Estos efectos son de suma importancia en la búsqueda de terapias contra la

obesidad; sin embargo, se requiere conocer los mecanismos implicados en el efecto del KF sobre el BE, de tal suerte que el uso de este flavonoide pueda ser optimizado para combatir esta enfermedad. En este sentido, el presente estudio tuvo como propósito evaluar la implicación de las vías intracelulares hipotalámicas, dependientes del sistema de las melanocortinas y del receptor de sales biliares TGR5 / DIO2, en los efectos metabólicos ejercidos por el KF, mostrados en el antecedente previamente mencionado (Romero-Juárez *et al.*, 2021).

MARCO TEÓRICO

1. Obesidad

1.1. Definición y prevalencia de la obesidad

De acuerdo con la WHO, la obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (WHO, 2021). Dicha afección es una enfermedad crónica de origen multifactorial, que resulta de la interacción entre genotipo y ambiente (Galicia-Negrete & Falfán-Valencia, 2017).

El grado de obesidad es determinado por el índice de masa corporal (IMC), el cual se determina a partir del PC y la altura, usando la fórmula: $IMC = PC / altura^2$. Un $IMC \geq 25$ refiere un sobrepeso, ≥ 30 obesidad y ≥ 40 es considerada obesidad mórbida (Dorfman & Thaler, 2015). Aunque en los últimos años se ha observado que este IMC no distingue entre el contenido de masa grasa ni masa magra, por lo que se han incorporado nuevos índices de medición, como la circunferencia abdominal y otras medidas antropométricas para mostrar la acumulación de grasa. Los valores de referencia para la circunferencia abdominal en hombres son de > 94 y > 80 cm en mujeres, respectivamente (Keihani *et al.*, 2015). A pesar de lo anterior, el IMC se sigue usando como una medida de referencia.

La prevalencia de esta enfermedad ha ido aumentando a lo largo del tiempo, pasando de un problema poco común a ser considerado el principal problema de salud del siglo XXI. Por lo general, dicha enfermedad fue asociada a estratos sociales altos, lo cual contrasta con las décadas recientes en las cuales se ha mostrado un aumento en su prevalencia en estratos sociales altos y bajos por igual, con una alta tasa de crecimiento en países en vías de desarrollo (Ando *et al.*, 2008). La WHO presenta datos alarmantes sobre la prevalencia mundial de obesidad; en 2016 más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso, de los cuales más de 650 millones eran obesos. Esto representa un 39% de la población mundial con sobrepeso y un 15% con un grado de obesidad (12% en hombres y 18% en mujeres). México tiene el segundo lugar a nivel mundial en sobrepeso y obesidad, sólo por detrás de EE. UU, de los países asociados a la OECD. Para el año 2030, las estimaciones no son alentadoras pues, pese a los esfuerzos gubernamentales de disminuir la prevalencia de

obesidad, se pronostica una proyección en EE. UU, México e Inglaterra con una prevalencia de 49%, 37% y 35%, respectivamente (OECD, 2019).

En México, el sobrepeso (obesidad incluida) representa un grave problema de salud pública, ya que afecta a una gran parte de la población, correlacionándose positivamente con la edad y de manera indistinta entre sexos y por la región del país (región urbana o rural). De igual forma, la ENSANUT mostró que en 2016 el 35.6% de los infantes, el 38.4% de adolescentes y el 75.2% de adultos padecían de algún grado de sobrepeso u obesidad (ENSANUT, 2021).

1.2. Relación de la obesidad con otras enfermedades

La obesidad es una enfermedad de suma importancia en salud pública, debido a su alto costo humano y económico. Su relevancia recae en que está estrechamente relacionada con otras enfermedades (**Figura 1**) como la hipertensión, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares y, sobre todo, DT2 (Piché *et al.*, 2020). Además, está asociada con otros padecimientos como la infertilidad, la apnea del sueño, la depresión, etc. (Cena *et al.*, 2020; Kurnool *et al.*, 2023). La masa grasa generada en la obesidad produce cambios estructurales y hemodinámicos en el sistema cardiaco, lo que lleva a una insuficiencia cardiaca (Carbone *et al.*, 2017; Kawarazaki & Fujita, 2016).

Por otro lado, la obesidad se relaciona con afecciones respiratorias y gástricas que son de origen mecánico, por la disminución en la capacidad residual funcional y del volumen corriente, estos cambios reducen el estiramiento de los músculos lisos (Galicia-Negrete & Falfán-Valencia, 2017). También aumenta el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (de mama, colon, hígado, entre otros) y se asocia con un peor resultado clínico de estos (Kolb *et al.*, 2016).

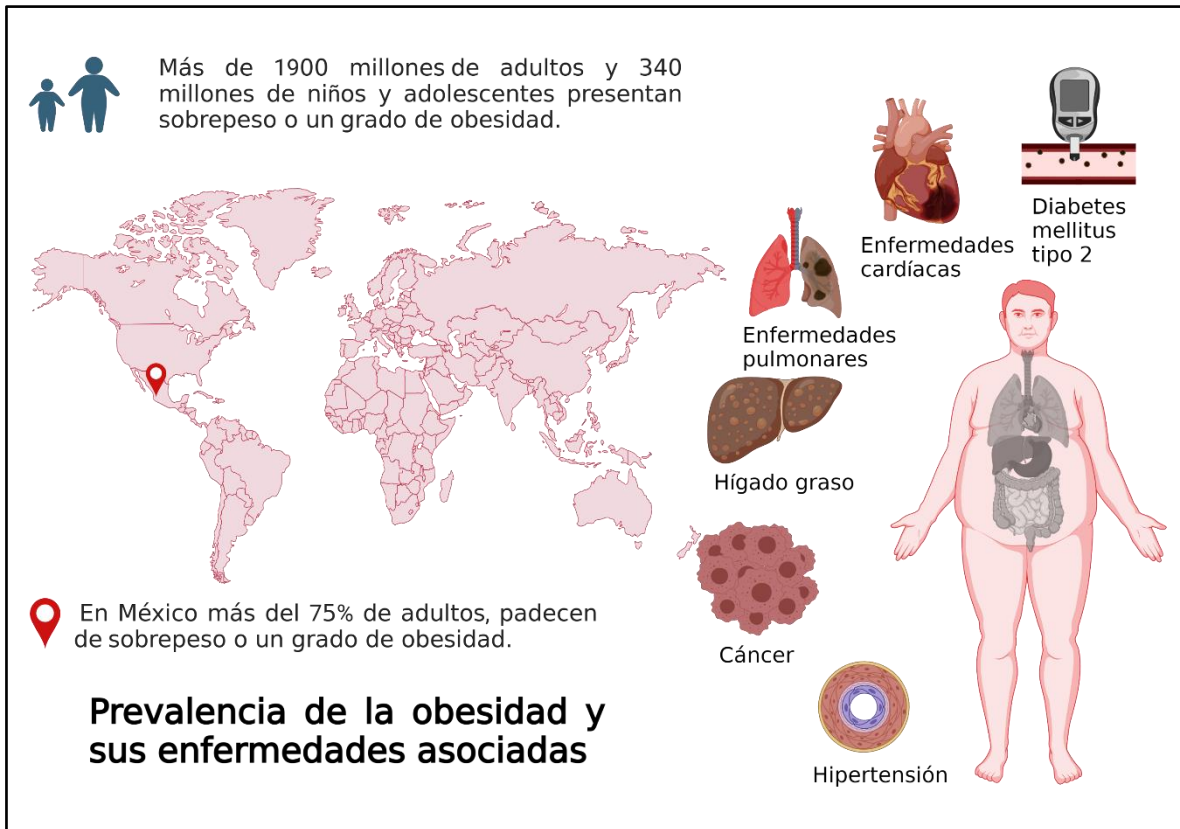


Figura 1. Prevalencia de la obesidad y su relación con otras enfermedades. La obesidad afecta a más de 1900 millones de adultos en nivel mundial, siendo México uno de los países con mayor prevalencia. Dicha condición médica se asocia con una gran variedad de enfermedades como son: el hígado graso no alcohólico, enfermedades cardíacas, algunos tipos de cáncer y en alrededor de 90 % con diabetes *mellitus* tipo 2. (Figura creada con Biorender.com)

2. Balance energético

El BE es el resultado de un equilibrio, en condiciones de salud, establecido entre el consumo de calorías provenientes de los alimentos y el GE (**Figura 2**). El BE es un proceso dinámico y existen efectos recíprocos entre el CA y el GE (Hopkins & Blundell, 2016). Dicho balance se encuentra regulado finamente en el sistema nervioso central, con un rol preponderante del hipotálamo (Farias *et al.*, 2017).

2.1. Regulación de la ingesta de alimento

La decisión de comer o no comer implica la interacción del hipotálamo y tejidos periféricos. Luego de la detección en el ARC de las señales nutricionales provenientes del tejido adiposo

(leptina), el páncreas (insulina) y tracto digestivo (grelina, péptido similar al glucágon-1 – GLP-1–, péptido YY –PYY–, etc.), así como de nutrientes como la glucosa, aminoácidos y ácidos grasos se establece el estado energético en el que se encuentra el organismo, generando respuestas que promueven un CA (si hay un déficit de energía) o la inhibición del mismo (si hay exceso de energía) (Farias *et al.*, 2017). La información sensorial derivada de la fase cefálica de la digestión y la señalización vagal aferente provocada por la presencia de alimentos en el estómago proporciona información temprana al cerebro sobre la cantidad y el contenido de nutrientes de los alimentos consumidos (Harpaz *et al.*, 2016; Hopkins & Blundell, 2016).

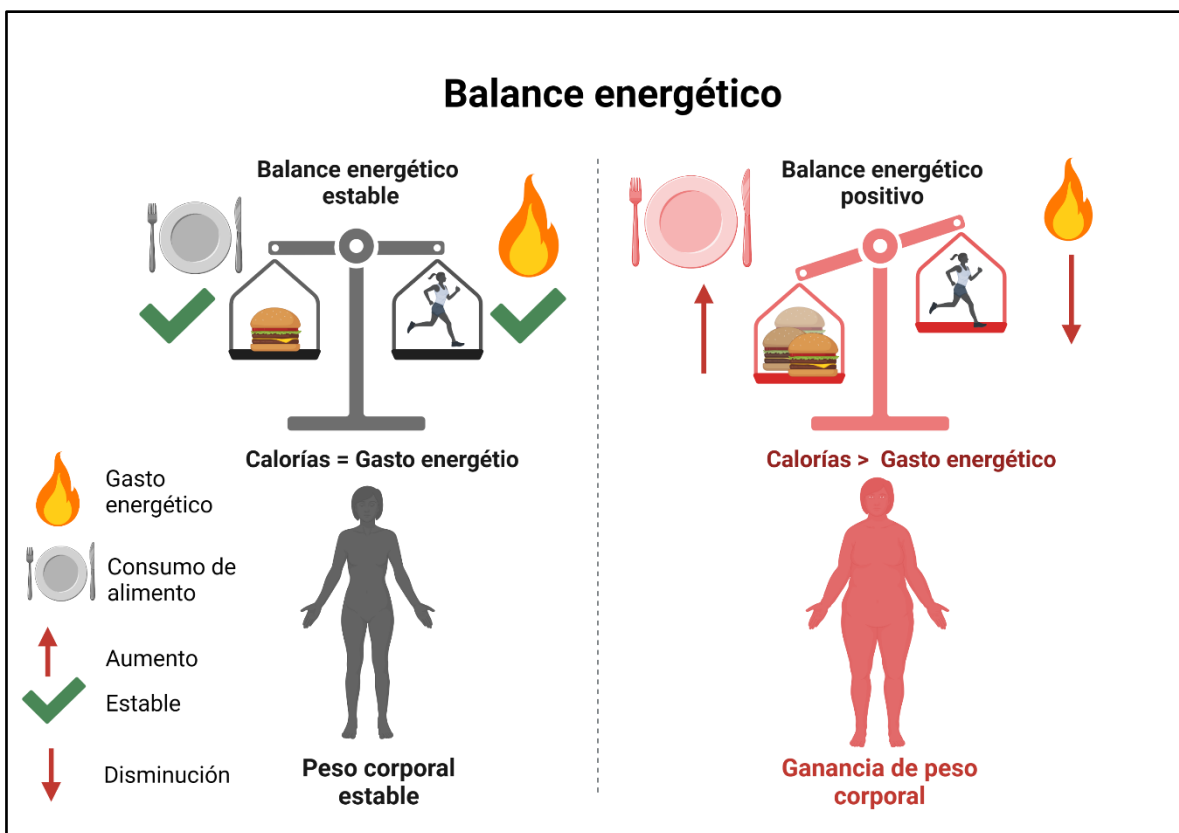


Figura 2. Regulación del balance energético. El balance energético, a grandes rasgos, consta de dos componentes, uno es la cantidad de calorías consumidas contra la capacidad del organismo de metabolizar las calorías consumidas. Cuando la balanza se encuentra en equilibrio entre el consumo de calorías y el gasto energético se tiene un peso corporal normal. Sin embargo, cuando el consumo de calorías supera la capacidad del organismo de metabolizar el contenido calórico, se da inicio al aumento de peso corporal. (Figura creada con Biorender.com)

2.2. Regulación del gasto energético

Los principales determinantes del GE son el tamaño y composición corporal, la ingesta de alimentos, el entorno y la actividad física. El GE se puede dividir en: GE en reposo, inducido por el ARC en el hipotálamo (termogénesis), GE inducido por la dieta y GE inducido por la actividad física (Westerterp, 2017).

2.3. Regulación del balance energético y la actividad física

La regulación del BE por actividad física o por los componentes del metabolismo energético siempre se han estudiado de manera independiente, sin embargo, en los últimos años se han establecido esfuerzos que pretenden correlacionar estos dos componentes (Blundell *et al.*, 2015). La disminución de la actividad física está estrechamente relacionada con un aumento en el peso corporal, así como con la composición corporal (parámetros metabólicos, la cantidad de tejido graso y la masa muscular) (Westerterp, 2018). También se ha demostrado que el ejercicio agudo y crónico regula la secreción de hormonas y péptidos relacionados con la regulación del BE (Ribeiro *et al.*, 2007; Stensel, 2011). Estos péptidos son transportados tanto por el nervio vago como por circulación sistémica y posteriormente son interpretados por el hipotálamo (**véase sección 2.4.**) (Blundell *et al.*, 2015; Hopkins & Blundell, 2016; Stensel, 2011). Esta estructura cerebral se ha identificado por ser una parte fundamental en el BE, además se sabe que el hipotálamo está involucrado en la regulación de la actividad física (Benfato *et al.*, 2017; Mavanji *et al.*, 2022).

2.3. Regulación hipotalámica del BE

En el cerebro, diferentes circuitos neuronales trabajan de manera sincronizada para mantener la homeostasis energética. Estos circuitos tienen su punto de convergencia en el hipotálamo, donde integran estímulos externos e internos para inducir respuestas metabólicas (Schaeffer *et al.*, 2014). El hipotálamo ha recibido una atención significativa dada su capacidad para influir en el comportamiento alimenticio y el GE, a través de la integración de señales nutricionales dirigidas por hormonas (leptina, insulina, grelina, etc.). El ARC en el hipotálamo juega un rol central en dichos procesos, ya que en esta estructura la barrera hematoencefálica es más permisiva para el transporte de compuestos de la sangre. Además, en este núcleo se encuentran neuronas de primer orden que detectan las señales hormonales,

las cuales extienden sus prolongaciones axonales a otros núcleos del hipotálamo (área hipotalámica lateral –LHA–, núcleo ventromedial –VMN– y núcleo paraventricular –PVN), donde activan neuronas de segundo orden, induciendo efectos anorexigénicos (inhibición del apetito) u orexigénicos (inducción del apetito) (Waterson & Horvath, 2015).

2.3.1. Vía intracelular del sistema de las melanocortinas en la regulación del BE

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

El sistema de las melanocortinas recibe señales hormonales y nutricionales que se secretan de la periferia en tejidos como el estómago (greлина), páncreas (insulina) y tejido adiposo blanco (leptina). Es conocido que estas hormonas y sus fluctuaciones en los niveles de concentración actúan de forma catabólica (leptina e insulina) y anabólica (greлина). Además,

este balance depende de los niveles circulantes de glucosa, ácidos grasos, aminoácidos y hormonas gastrointestinales que reflejan el estado nutricional del organismo (Caron & Richard, 2017). La leptina regula tanto las neuronas POMC/CART como NPY/AgRP, esta hormona aumenta los niveles de los ARN mensajeros (mRNA) de POMC y disminuye los de NPY/AgRP, así como despolariza (activa) las neuronas POMC, simultáneamente hiperpolariza (desactiva) neuronas NPY/AgRP. Por otro lado, los receptores de insulina (IR) se expresan ampliamente en el cerebro, y la evidencia es controversial, ya que los ratones con deficiencia de este receptor en el cerebro desarrollan obesidad; sin embargo, la eliminación de este receptor en el sistema de las melanocortinas, no mostró alteración, lo cual sugiere la activación de diferentes subpoblaciones de POMC en la homeostasis energética (Derghal *et al.*, 2017). La grelina, conocida como la hormona del hambre, se sintetiza como una prohormona y se requieren varios procesos para su forma activa, la cual ejerce su efecto a través de la unión al receptor del secretagogo de la hormona de crecimiento (GHSR), que se expresa altamente en neuronas NPY/AgRP. Además, la grelina eleva la concentración de mRNA de NPY/AgRP, y promueve una mayor actividad eléctrica. También regula positivamente la prolilcarboxipeptidasa, enzima que degrada la α -MSH (Kim *et al.*, 2014).

2.3.2. Vía intracelular del receptor TGR5 / DIO2 y su rol en el BE

El receptor TGR5 (Receptor Takeda 5 acoplado a proteína G) es un receptor membranal con reconocidos efectos metabólicos y antiinflamatorios, cuyos ligandos endógenos son las sales biliares (Duboc *et al.*, 2014). Se encuentra altamente distribuido tanto en tejidos periféricos como en el cerebro (Keitel *et al.*, 2010). Un estudio reciente, realizado por nuestro equipo de trabajo, mostró que la activación de este receptor en el hipotálamo, donde fue identificado y caracterizado, juega un rol preponderante en la regulación del BE y del PC (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021). De manera interesante, se ha demostrado que varios fitoesteroides son agonistas exógenos de este receptor; el ácido oleanólico, el ácido betulínico y la nomilina son ejemplos de agonistas de origen vegetal (Sasaki *et al.*, 2017). Por otro lado, se ha observado que la activación de TGR5 disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias como interleucina 1 α (IL-1 α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Guo *et al.*, 2016). También se ha mostrado que la estimulación de este receptor aumenta la activación de la enzima DIO2, vía la producción del segundo

mensajero monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (Duboc *et al.*, 2014). El TGR5 se expresa en una gran cantidad de tejidos, tales como la placenta, el bazo, los pulmones e incluso en células del SNC, como la microglía y los astrocitos (Watanabe *et al.*, 2006).

La enzima DIO2 juega un rol importante en la regulación del BE (**Figura 3**), catalizando la conversión de la hormona tiroidea tiroxina (T4) a triyodotironina (T3), su forma bioactiva. La T3 no sólo estimula el gasto energético a través de la termogénesis, sino que también reduce la acumulación de lípidos en el tejido adiposo (TA), aumenta la función mitocondrial, disminuye la inflamación y el metabolismo potencialmente sistémico (Bradley *et al.*, 2018). Su acción a nivel hipotalámico promueve el GE asociado a la termogénesis corporal en tejidos periféricos (Saito *et al.*, 2020). Lo anterior ha generado un gran interés en sus efectos sobre el tejido adiposo pardo (BAT) y las células beige del tejido adiposo blanco (WAT). De igual forma, se ha demostrado que T3 tiene funciones termogénicas en ambos tejidos actuando degradando los ácidos grasos y disipando calor (Yau *et al.*, 2018). Cabe mencionar que las células adiposas se correlacionan positivamente con el sobrepeso y la obesidad (Liu *et al.*, 2019). También se ha reportado que DIO2 se expresa no sólo en tejidos adiposos, sino también en otros tejidos como el cerebro y la glándula pituitaria; de manera interesante, el producto de DIO2, la hormona T3, se encuentra en altas concentraciones en el cerebro (Bernal, 2015). Estos datos sugieren que la vía intracelular TGR5 / DIO2 juega un rol de marcada importancia en el balance energético (**Figura 3**).

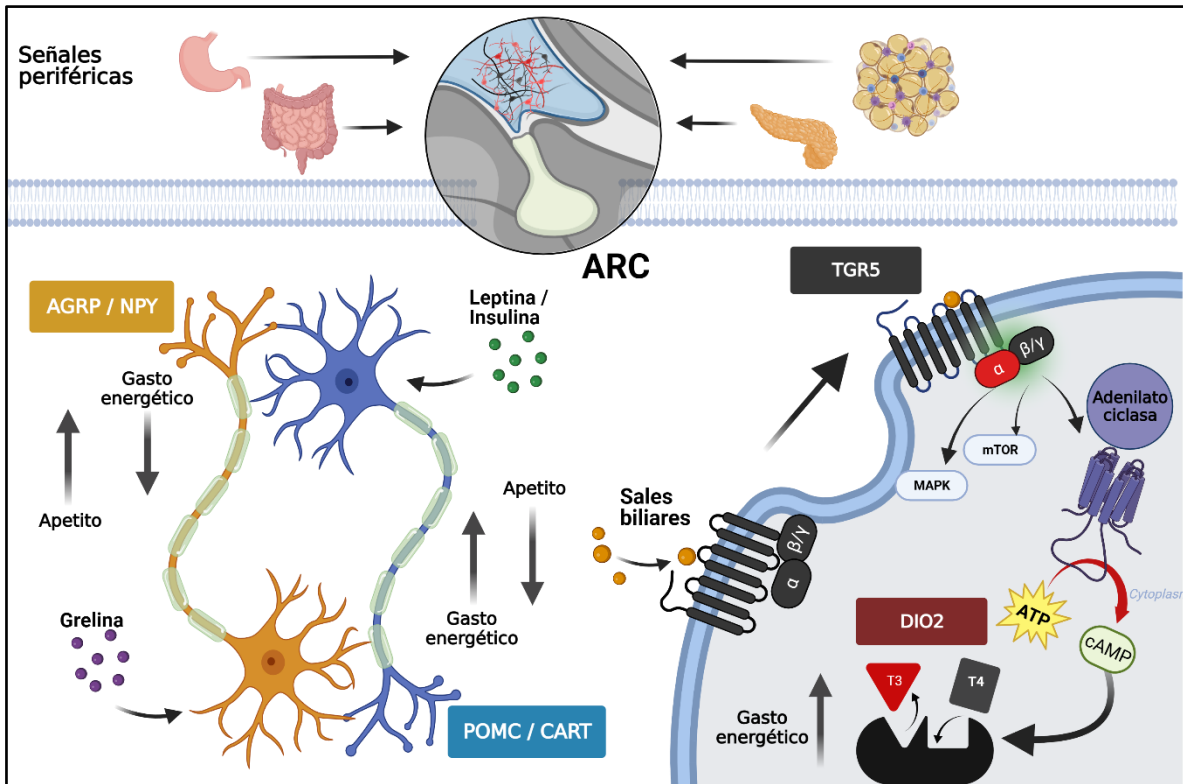


Figura 3. Regulación hipotalámica del balance energético. El núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo juega un rol crucial en el balance energético, en dicha estructura convergen una serie de vías y sistemas intracelulares que regulan el balance energético. Uno de los sistemas ampliamente estudiados en el ARC es el sistema de las melanocortinas, el cual se constituye de dos poblaciones neuronales antagónicas entre sí; las neuronas que expresan POMC, las cuales incrementan el gasto energético y disminuyen la sensación de apetito; por otro lado, se encuentran las neuronas que expresan AGRP / NPY, éstas disminuyen el gasto energético e incrementan la sensación de apetito. Otra de las vías involucradas en el BE es la vía TGR5 / DIO2, dicha vía es conocida por aumentar la termogénesis, un mecanismo de disipación de energía que incrementa el gasto energético. Dichas poblaciones neuronales reciben e interpretan señales nutricionales y hormonales provenientes de órganos de la periferia, que comunican el estado nutricional del organismo. (Figura creada con Biorender.com)

2.3.3. Sistemas reguladores del balance energético en la obesidad

La disminución de la actividad física (sedentarismo), está ampliamente relacionado con el aumento del peso corporal y una acumulación de tejido graso (Ortega *et al.*, 2013). Sin embargo, los mecanismo moleculares aún no se han establecido por completo (Pojednic *et al.*, 2022). Esto puede deberse a que este regulador del BE solo representa entre un 20 a un 30 % del gasto energético (Westerterp, 2018).

En los últimos años, se ha hecho evidente el rol del cerebro en el desarrollo de la obesidad (**Figura 4**). La mayor parte de la evidencia apunta al desacoplamiento de la regulación del BE debido al desarrollo de un cuadro de inflamación en el hipotálamo, inducido por el consumo de dietas hiperlipídicas (HFD) (Dorfman & Thaler, 2015). Diversos estudios han demostrado que la dieta rica en grasa, en particular los ácidos grasos saturados de cadena larga (SFA), inducen dicha inflamación (De Souza *et al.*, 2005). De igual forma se ha mostrado que la inflamación hipotalámica es esencial para el desarrollo de la obesidad (Valdearcos *et al.*, 2011; André *et al.*, 2017). Una inflamación aguda aumenta la expresión de POMC, así como del receptor de melanocortina 4 (MC4R) (Dwarkasing *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2010). Sin embargo, en procesos de inflamación crónica tanto POMC como MC4R se ven disminuidos (Dwarkasing *et al.*, 2014; Dwarkasing *et al.*, 2016). Muchos de los efectos metabólicos de las hormonas tiroideas (TH) pueden atribuirse a sus acciones directas sobre los tejidos periféricos, donde ejercen una amplia gama de efectos sobre la fisiología hepática, como el metabolismo de los lípidos, el colesterol y la glucosa. Sin embargo, existe poca información sobre el papel de las TH en la regulación del balance energético por acciones directas en el sistema nervioso central (SNC) (Wu *et al.*, 2016). Un estudio mostró datos controversiales donde el consumo de una HFD provocó la activación de la Cinasa c-Jun N-terminal (JNK) en la glándula pituitaria anterior, lo cual aumenta la expresión de DIO2, y con ello se produce una disminución del gasto de energía y el desarrollo de obesidad, además se ha reportado que en pacientes obesos los niveles de hormonas pertenecientes al eje hipotálamo-pituitaria-tiroides son normales, a excepción de la T3 (Kokkoris & Pi-Sunyer, 2003; Vernia *et al.*, 2013). Un determinante clave de la acción de las TH en el cerebro es la deiodinasa tipo 3 (DIO3), que cataliza la conversión de T4 y T3 en metabolitos inactivos y en ratones con deficiencia de DIO3 atenúa la ganancia de peso corporal (Wu *et al.*, 2016). Por último, el sistema de señalización de TGR5 ha sido estudiado recientemente a nivel central por nuestro equipo de trabajo. En particular, se demostró su participación en la regulación hipotalámica del BE, por lo cual representa una diana terapéutica innovadora para el tratamiento de la obesidad (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021). Sin embargo, en procesos de obesidad la acción reguladora de este receptor no se comprende del todo, algunos estudios indican que puede ser una alteración en la reabsorción de sus ligandos endógenos (sales

biliares), así como en la interacción de estos con la microbiota intestinal (Chávez-Talavera *et al.*, 2017).

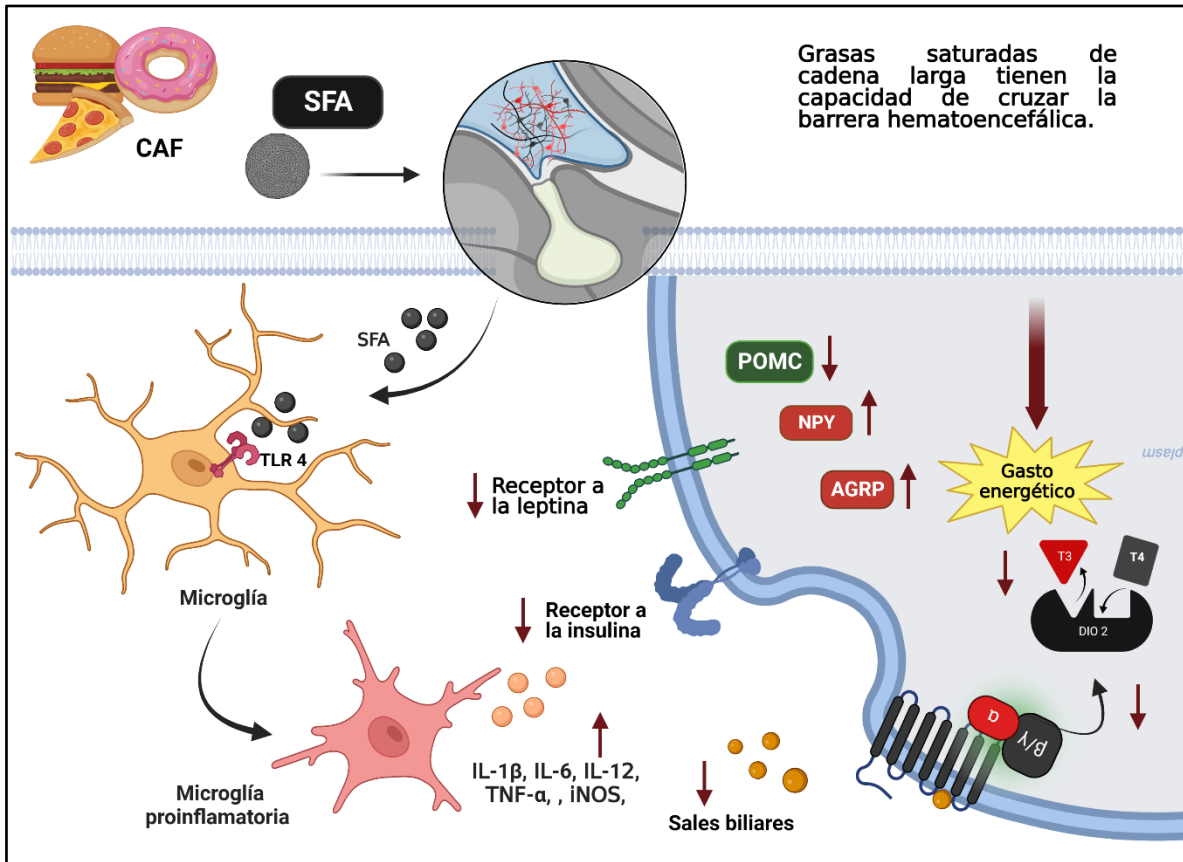


Figura 4. Dietas altas en grasas saturadas modifican el correcto funcionamiento de los sistemas reguladores del balance energético. Las dietas altas en grasas saturadas generan una inflamación a nivel central (incluso antes de percibir un fenotipo obeso). Los ácidos grasos de cadena larga activan la respuesta inflamatoria a través del receptor tipo tol 4 en células microgliales, las cuales liberan al medio citocinas proinflamatorias que inhiben el correcto funcionamiento neuronal a través la disminución en la liberación de POMC (proopiomelanocortina) a los núcleos paraventriculares para transmitir la señal de saciedad. De igual forma, la inflamación central genera una resistencia a la leptina (hormona reguladora del sistema de las melanocortinas). Finalmente, las dietas altas en grasas disminuyen la cantidad de sales biliares en el ARC, por lo cual existen pocos y deficientes agonistas de TGR5. SFA: ácidos grasos esterificados; CAF: dieta de cafetería; IL-1 β : interleucina 1 β , IL-6: interleucina 6; IL-12: interleucina 12; TNF α : factor de necrosis tumoral α ; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; NPY: neuropéptido Y; AGRP: proteína relacionada con agouti. (Figura creada con Biorender.com).

3. Kaempferol

El KF es un compuesto polifenólico de color amarillo y de bajo peso molecular (PM 286.23 g/mol), con una estructura policíclica y rodeado de grupos hidroxilos, cuyo nombre de acuerdo a la IUPAC es 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirán-4-ona, que se encuentra comúnmente en alimentos (frutas y verduras) y en plantas de la medicina tradicional. En plantas actúa como un fitoestrógeno con funciones antioxidantes que brindan protección a la planta, además de intervenir en las relaciones planta-microorganismos (Mierziak *et al.*, 2014). Su síntesis en plantas es muy compleja; al igual que otros flavonoides, el KF se sintetiza a partir de un difenilpropano, cuya reacción es catalizada por varias enzimas hasta la unión de varios azúcares como: glucosa, ramosa y rutinosa para formar glucósidos (Calderon-Montano *et al.*, 2011).

Este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal (**Figura 5**). En varios estudios se ha determinado la cantidad de este flavonoide; entre los alimentos en los que se encuentra mayormente presente tenemos el nopal, el brócoli, la cebolla, la papaya, la guayaba, las moras, el té verde, el té negro, en bayas comestibles, etc. (Miean & Mohamed, 2001).

3.1. *Kaempferol y su rol en la regulación del metabolismo energético*

Además de los efectos inhibidores de la proliferación celular en el cáncer, el KF presenta acciones importantes en la regulación del metabolismo energético (**Figura 5**). Varios estudios han reportado que dietas ricas en polifenoles, entre ellos el KF, tienen un efecto antiobesogénico, atenuando el aumento del PC, así como las concentraciones de metabolitos sanguíneos (glucosa, triglicéridos, etc.). En efecto, el consumo de un extracto de té (*Sanglan tea*), rico en KF y quercetina, suprime la expresión de genes claves de la lipogénesis y adipogénesis en hígados de ratones obesos (Guruvaiah *et al.*, 2018). Estos datos son consistentes con otro estudio en ratón en el que se implementó una dieta con KF, la cual disminuyó el estado de obesidad, reduciendo la adiposidad, los niveles plasmáticos de lípidos, y produjo una mejora en la resistencia a la leptina y a la insulina (Zang *et al.*, 2015). Los efectos del KF descritos arriba han sido observados igualmente en células aisladas, donde se observó la disminución en la acumulación celular de lípidos (Gómez-Zorita *et al.*, 2017).

Estudios en diferentes modelos experimentales, como ratones y cultivos celulares, han mostrado un aumento de la expresión de los genes involucrados en el catabolismo de lípidos (Torres-Villarreal *et al.*, 2019).

Otros datos de la literatura muestran al KF como una molécula capaz de regular la vía de señalización de la tiroidea, induciendo GE dependiente de la termogénesis (da-Silva *et al.*, 2007). En estudios recientes con cultivos celulares de músculo esquelético, se observó que el KF aumenta el GE al regular genes termogénicos y metabólicos (McAninch & Bianco, 2014). Además, aumenta la producción y tiempo de vida media de la DIO₂, traducándose en un aumento de la activación de la hormona tiroidea, es decir el paso de T₄ a T₃ (da-Silva *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha reportado que el tratamiento intraperitoneal con KF incrementó la expresión del mRNA de POMC en el hipotálamo, en un modelo de depresión (Park *et al.*, 2010).

Pese a todos estos estudios realizados, aún se desconoce si en modelos *in vivo* el KF puede activar la vía de la termogénesis en el ARC del hipotálamo. Como antecedente directo al presente trabajo, recientemente nuestro equipo de trabajo mostró que el tratamiento crónico vía intraperitoneal (i.p.) con KF mejora la homeostasis de la glucosa y disminuye el PC, sin cambios en el CA y una reducción de la eficiencia alimentaria, probablemente debido a una inducción del GE (Romero-Juárez *et al.*, 2021). Dado que los efectos anteriores son regulados críticamente en el hipotálamo, se procedió a analizar los efectos agudos de la administración i.c.v. del KF sobre el BE. Dicha administración central reprodujo los efectos observados con la administración i.p. (Romero-Juárez *et al.*, 2021), sugiriendo que el KF ejerce sus efectos metabólicos a nivel hipotalámico. Consistente con ello, el mismo estudio mostró que la atenuación del fenotipo obeso por el tratamiento i.p. se asoció con una disminución de la activación de la microglía (disminución de la inflamación) inducida por una dieta HFD a nivel del ARC (Romero-Juárez *et al.*, 2021). Considerando lo mencionado anteriormente, si el KF ejerce sus efectos metabólicos actuando a nivel del hipotálamo, se espera que involucre vías intracelulares ligadas a dicha estructura cerebral. En ese sentido, el presente trabajo plantea analizar la activación de componentes del sistema de las

melanocortinas y de la vía de TGR5 / DIO2 en respuesta a la administración i.c.v. de KF en ratones obesos.

Hasta el momento no se han reportado estudios donde evalúen el efecto del kaempferol a nivel central sobre la actividad física. Sin embargo, se ha reportado que la combinación de una dieta alta en polifenoles o resveratrol y un régimen de actividad física mejora el estado metabólico del organismo (Da Fonseca Cardoso *et al.*, 2021). De igual forma se ha establecido que la suplementación con polifenoles antes y después de la actividad física mejora la recuperación muscular en atletas de alto rendimiento a través de mecanismos antiinflamatorios (Bowtell & Kelly, 2019). Dentro de estos polifenoles, el KF mostró una capacidad para mejorar la función motora en ratones con fatiga muscular a través de una disminución del estrés oxidativo (Shibuya *et al.*, 2022).

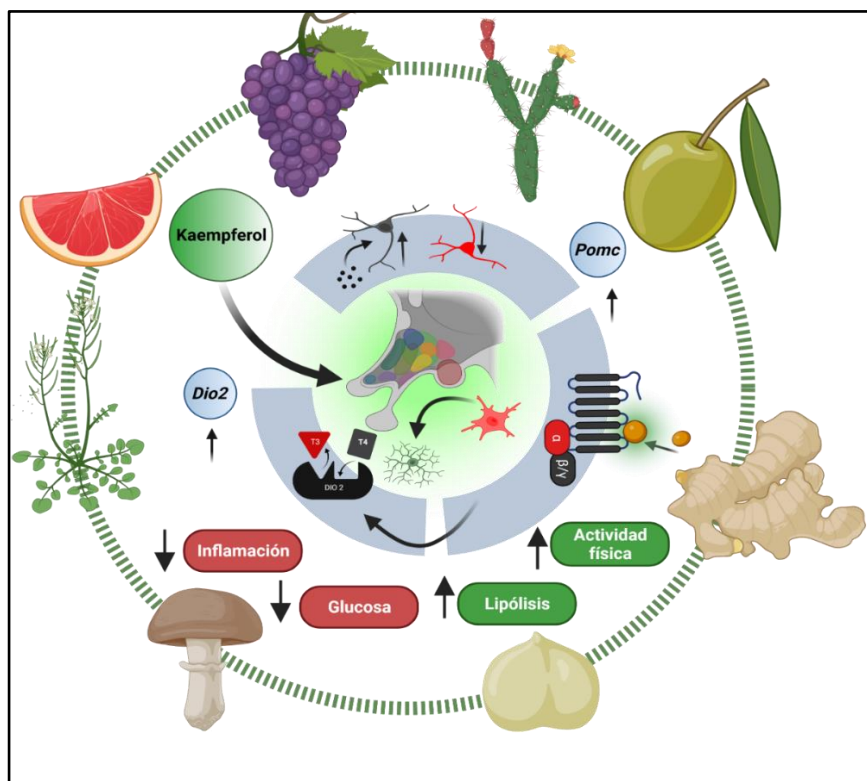


Figura 5. Distribución y propiedades del kaempferol. El KF es un flavonoide altamente distribuido en el mundo vegetal e incluso se ha reportado en algunos tipos de hongos. Este flavonoide ha mostrado propiedades antiinflamatorias, hipoglucemiantes y es un inductor de la lipólisis. También ha demostrado la capacidad de aumentar la POMC (proopiomelanocortina) e incrementar la expresión de *Dio2* (deiodinasa 2). Además, se ha reportado un efecto sobre la microbiota intestinal que se traduce en un aumento de las sales biliares circulantes. (Figura creada con Biorender.com)

JUSTIFICACIÓN

La obesidad es uno de los problemas de salud más devastadores en el mundo; en 2016 más de 1900 millones de adultos y 340 millones de niños y adolescentes presentaban esta enfermedad. En México, el sobrepeso (obesidad incluida) representa actualmente el mayor problema de salud pública, ya que afecta a una gran parte de la población (35.6% de los infantes, 38.4% de adolescentes y el 75.2% de adultos), colocándolo como uno de los países con mayor prevalencia. También se ha estipulado que la obesidad y sus comorbilidades representan alrededor del 60% del gasto total en salud del país. Además, se encontró que las personas obesas tenían costos médicos que eran aproximadamente un 30% mayores que las personas no obesas. Pese a las estrategias gubernamentales para disminuir la incidencia de obesidad en la población, la prevalencia no dejará de aumentar (OECD), inclusive en los estratos socioeconómicos más bajos, por lo cual es imprescindible buscar estrategias terapéuticas accesibles y asequibles para todo tipo de población.

En este contexto, la utilización de compuestos de origen vegetal, los cuales poseen baja toxicidad, ha generado un gran interés como una estrategia terapéutica. Dentro de dichos compuestos están los flavonoides, compuestos que provienen del metabolismo secundario de las plantas y de algunos hongos. Dentro de estos polifenoles está el KF, dicho flavonoide está altamente distribuido en el reino vegetal, también se conoce que este compuesto tiene propiedades beneficiosas relacionadas con la inflamación y el metabolismo, dos factores esenciales en el desarrollo de la obesidad. En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo, se demostró que el KF ejerce efectos metabólicos y antiinflamatorios a nivel central en ratones obesos expuestos a una HFD. Sin embargo, se hace imprescindible dilucidar el mecanismo por el cual el KF ejerce su efecto antiobesogénico. En este sentido, este trabajo planteó estudiar la implicación de ciertas vías intracelulares hipotalámicas relacionadas con el metabolismo y el BE, como es el caso del sistema de las melanocortinas, la vía de señalización de TGR5, así como la vía de la tiroides. Conocer los mecanismos referidos, podría ayudar a dirigir estrategias terapéuticas efectivas contra la obesidad, reduciendo su alto impacto social y económico.

HIPÓTESIS

El kaempferol ejerce sus efectos antiobesogénicos a través de la modulación de las vías intracelulares hipotalámicas implicadas en la regulación del balance energético.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar los mecanismos hipotalámicos implicados en los efectos metabólicos del kaempferol en ratones obesos inducidos por una dieta hipercalórica.

2. Objetivos específicos

I. Determinar el efecto agudo de la administración i.c.v. de kaempferol sobre el PC y CA en ratones obesos.

II. Evaluar el efecto agudo del tratamiento i.c.v. con kaempferol sobre el control de la glucemia en ratones con obesidad.

III. Analizar cambios en la expresión de componentes clave del sistema de las melanocortinas, del receptor TGR5 y de la tiroides en respuesta al tratamiento i.c.v. con kaempferol en ratones obesos.

IV. Determinar el efecto del tratamiento central con KF sobre la actividad física, el estrés y la conducta tipo ansiosa.

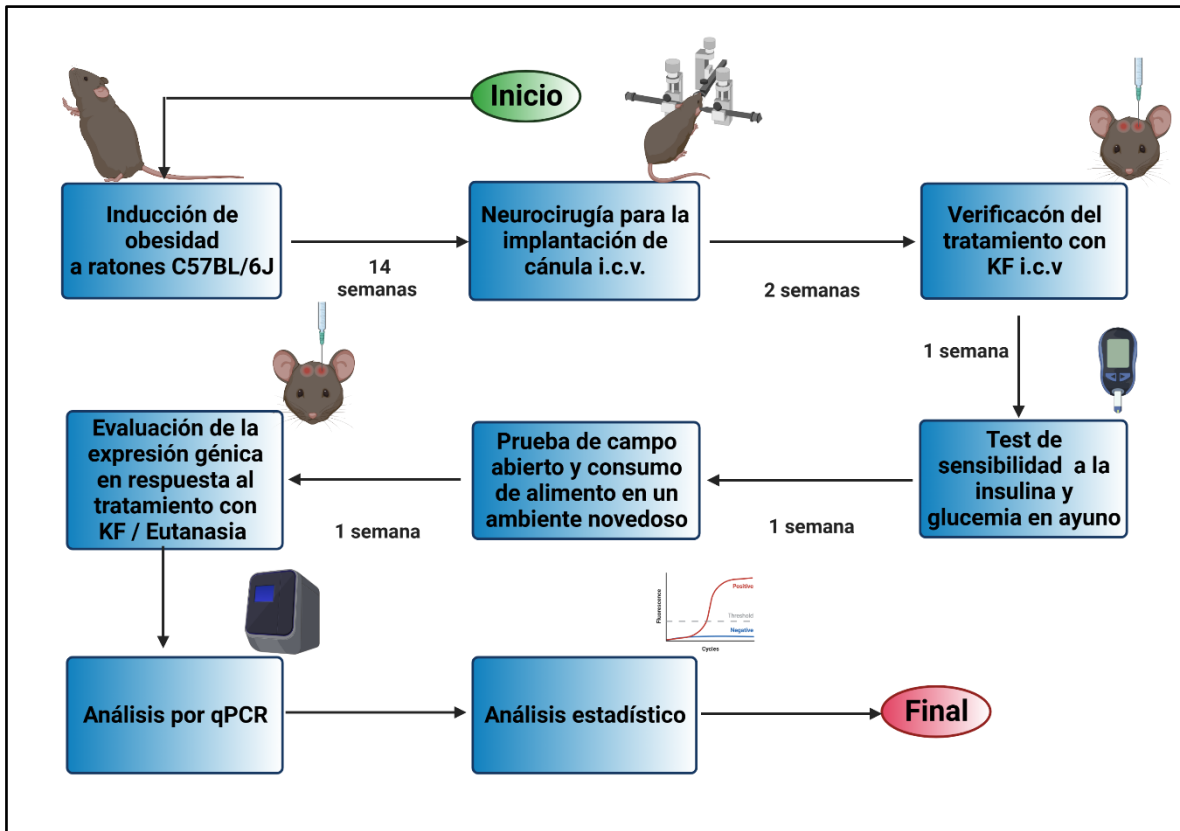


Figura 6. Estrategia experimental. El trabajo inició con la inducción de la obesidad, para lo cual ratones de la cepa C57BL/6J fueron sometidos por 14 semanas a una alimentación hipercalórica basada en una dieta de cafetería. Una vez que el cuadro de obesidad fue establecido, los ratones fueron sometidos a una neurocirugía para la implantación de una cánula i.c.v. en las siguientes coordenadas estereotáxicas: anteroposterior -0.5 mm; mediolateral -1.2 mm y dorsoventral -2.1 mm, respecto del bregma. El peso corporal de los ratones se monitoreó por dos semanas después de la cirugía, para verificar la correcta recuperación. La verificación del efecto de la administración i.c.v. de KF sobre el PC y el CA se realizó una vez los animales se encontraron totalmente recuperados de la cirugía. Para cumplir con este objetivo los ratones se sometieron a 24 h de ayuno, posteriormente fueron inyectados con 5 μ g de KF disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) y se evaluó PC y CA. Una semana después se realizó la prueba de sensibilidad a la insulina, para lo cual los ratones se sometieron a un ayuno de 6 h, posteriormente se determinó la glucemia en ayuno (tiempo 0 igual a glucemia basal), seguido de esto fueron tratados con 5 μ g de KF i.c.v. y se evaluó las concentraciones de glucosa en sangre a los 15, 30, 60, 90 y 120 min. Se monitoreó la recuperación de los ratones una semana, posteriormente se realizó la prueba del campo abierto y consumo de alimento en un campo novedoso en ratones con 24 h de ayuno y tratados i.c.v. con 5 μ g de KF. Por último, se realizó la evaluación *ex vivo* de la expresión de los genes reguladores del balance energético en ratones con 24 h de ayuno, los cuales fueron tratados con 5 μ g de KF de manera central y después de 2 h se les realizó la eutanasia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los experimentos se realizaron en ratones macho de la cepa C57Bl/6J, los cuales se obtuvieron del Instituto de Neurobiología de la UNAM (Juriquilla, Querétaro, México). Los ratones fueron mantenidos en ciclos de luz/oscuridad de 12 h (inicio del ciclo de luz a las 07:00) y a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, con acceso *ad libitum* a comida y a agua, a excepción de los días de experimentación. El manejo de los animales se realizó siguiendo estrictamente las pautas del reglamento nacional (NOM-062-ZOO-1999) y de reglamentos internacionales (Institutos Nacionales de Salud) para el cuidado y uso de animales de laboratorio, enfatizando en evitar al máximo todo sufrimiento.

2. Inducción de un cuadro de obesidad

Ratones de ocho semanas de edad fueron expuestos por 14 semanas a una dieta de cafetería (CAF), un modelo de obesidad validado en la literatura científica (Bonfim *et al.*, 2021). Durante la exposición a esta dieta, se ofertaron tres diferentes alimentos ultra procesados por día, con un menú diferente por día (**Tabla 1**). La dieta estándar para roedores se mantuvo siempre disponible junto a la dieta CAF (Bonfim *et al.*, 2021; Lang *et al.*, 2019). Se realizó un seguimiento semanal del progreso de la ganancia de peso corporal durante las catorce semanas. La composición nutricional y calórica de los alimentos ofertados fueron calculados de acuerdo con sus tablas nutrimentales, la cual es presentada en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Alimentos ofertados en la dieta para la inducción de obesidad. La dieta consta de tres diferentes alimentos por día de la semana, además de la dieta estándar que permanece siempre.

Día de la semana	Alimento 1	Alimento 2	Alimento 3	Alimento 4
Lunes	Galletas rellenas de crema (tipo oreo)	Galletas rellenas de chocolate	Salchicha de res	Dieta estándar
Martes	Galletas Saladitas	Galletas suavicremas	Salchicha	Dieta estándar
Miércoles	Galletas de maizena	Palomitas dulces	Pizza	Dieta estándar

Jueves	Pan blanco	Panecillo relleno de chocolate	Jamón	Dieta estándar
Viernes	Frituras de maíz	Galleta de maizena	Hamburguesa de res	Dieta estándar
Sábado	Papas fritas	Galletas rellenas de chocolate	Salchicha de res	Dieta estándar
Domingo	Cheetos	Galletas rellenas de chocolate	Jamón	Dieta estándar

Tabla 2. Aporte calórico y datos nutrimentales de los diferentes alimentos ofertados en la dieta CAF. Cantidades expresadas como g o mg por cada 100 g de alimento.

Alimentos ofertados	Kcal	Carbohidratos (g)	Proteínas (g)	Lípidos (g)	Grasas saturadas (g)	Fibra (g)	Sodio (mg)
Frituras de maíz	497.0	56.9	6.6	25.8	3.4	4.8	10.0
Galleta de maizena	509.0	64.7	5.0	25.7	13.0	1.7	70.3
Hamburguesa	305.0	13.0	16.0	13.0	6.0	2.0	0.0
Saladitas	376.9	69.2	7.7	7.7	7.7	0.0	1415.4
Galletas suavicremas	576.0	64.0	8.0	32.0	28.0	0.0	0.0
Salchicha de cerdo	127.7	12.4	6.3	5.8	2.0	0.5	871.0
Palomitas dulces	383.3	70.0	3.3	10.0	6.7	13.3	296.7
Jamón	91.3	6.7	12.0	1.9	0.5	0.0	961.5
Pan de pieza dulce	223.0	30.5	3.7	9.8	1.9	1.4	67.0
Pastelillos rellenos	347.5	57.5	5.0	11.3	7.5	2.5	212.5
Galleta rellena de crema (tipo oreo)	471.0	67.4	4.5	20.4	5.1	1.1	348.0
Galleta rellena de chocolate	470.4	69.6	6.6	17.9	10.3	1.9	263.4
Salchicha de res	177.0	5.1	12.9	11.8	5.8	0.0	930.0

Papas fritas	469.0	63.0	7.0	22.0	12.0	30.0	498.0
Pizza	231.5	29.6	9.8	8.1	3.7	0.0	0.0
Cheetos	540.0	53.3	6.7	33.3	11.7	3.3	600.0
Total	5845. 1	720.6	114.8	250.7	123.2	62.0	5672. 8

3. Determinación del efecto agudo de la administración central de KF sobre el BE

3.1. Neurocirugía para implantación de cánula i.c.v.

Para establecer la capacidad del KF de modular a nivel central el BE se usaron ratones con 14 semanas de inducción de obesidad a los cuales se les implantó estereotáxicamente una cánula de acero inoxidable (Plastics one, Inglaterra) en el ventrículo lateral derecho (coordenadas: anteroposterior -0.5 mm; mediolateral -1.2 mm y dorsoventral -2.1 mm, del bregma). Dicha cirugía se llevó a cabo en ratones anestesiados con ketamina (100 mg/kg) (Sedalphorte, México) y xilazina (10 mg/kg) (Pisa, México), inyectados vía i.p.

3.2. Verificación del efecto de la administración de KF sobre el PC y el CA

Después de dos semanas de recuperación postoperatoria, los ratones se sometieron a un ayuno de 24 horas, para inducir el apetito y evaluar de manera controlada el CA y cambio de PC. Posteriormente, se realizó un tratamiento i.c.v., inyectando 5 µg de KF disuelto en dimetil sulfoxido (DMSO) (n=13). Dicha dosis fue elegida con base en observaciones previas en nuestro equipo de investigación, las cuales mostraron un efecto sobre el BE (Romero-Juárez *et al.*, 2021). Después de la inyección se regresó el alimento a los animales y se evaluó el CA 1, 2, 4 y 24 horas después de la aplicación, así como el PC al iniciar y 24 horas post aplicación, para determinar el cambio de peso corporal usando una balanza digital (Sartorius, Alemania). La eficiencia alimentaria fue también calculada usando el consumo calórico y el cambio de peso, con la fórmula: $EA = (\text{ganancia de peso corporal} / \text{calorías ingeridas}) \times 100$. Un grupo control (n=14), el cual recibió DMSO (vehículo), también fue incluido en el estudio.

4. Evaluación de la administración i.c.v de KF sobre la glucemia

4.1. Test de sensibilidad a la insulina

Los ratones fueron sometidos a 6 horas de ayuno para homogeneizar los niveles de glucosa en todos los animales. Posteriormente, se inyectó una dosis de KF de 5 μg (i.c.v.) (n=7) o vehículo (DMSO) al grupo control (n=6), y se dejó actuar al compuesto por 1 hora. Transcurrido este tiempo se determinó la glucemia basal (punto 0). Enseguida, se les administró de manera intraperitoneal (i.p.) una carga exógena de insulina de 0.75 U/kg (AMSA, México), que se disolvió en solución salina. Posteriormente se tomaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 15, 30, 60, 90 y 120 min (Romero-Juárez *et al.*, 2021).

4.2. Concentración de glucosa en respuesta a la inyección i.c.v. de KF en ratones con 24 horas de ayuno

Los ratones se sometieron a 24 horas de ayuno, posteriormente a un grupo de ratones se les administró 5 μg i.c.v. de KF (n=8), mientras que otro grupo recibió una inyección de DMSO (grupo vehículo) (n=9). Después de 2 horas se realizó la eutanasia por decapitación, y se tomó una muestra de sangre troncal para medir la concentración plasmática de glucosa con ayuda de un glucómetro (OneTouch®, México).

5. Efecto del tratamiento agudo i.c.v. con KF sobre la expresión génica de componentes de vías hipotalámicas reguladoras del BE

5.1. Obtención de tejido hipotalámico

Para estudiar cambios en la expresión de genes implicados en el BE, en respuesta al tratamiento con KF, se realizó un muestreo de tejido fresco de hipotálamo. Para ello, a ratones con 24 horas de ayuno se les administró vía i.c.v. una dosis de 5 μg de KF. Después de 2 horas los ratones fueron eutanasiados por decapitación. Posteriormente se recolectó el tejido hipotalámico y se congeló en Trizol a -30°C hasta su procesamiento (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021).

5.2. Extracción de mRNA y retrotranscripción (RT)

Se extrajo el ARN total de los tejidos hipotalámicos con el método de Trizol – cloroformo (Invitrogen, Camarillo, CA). Las muestras que fueron contaminadas o degradadas se excluyeron del estudio. Un total de 2 µg de ARN, extraído por muestra, sometido a una transcripción en una solución de reacción de 15 µL, que contenía 1 µL de oligo dT 500 µL/mL (PROMEGA, Camarillo, CA), 2 µL dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 mM cada uno (PROMEGA, Camarillo, CA), tampón de primera hebra y 200 U de M-MLV transcriptasa inversa, a 37°C durante 50 minutos y se inactivó la enzima con calor a 70°C (Roque *et al.*, 2016).

5.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo en el producto de la retrotranscripción para determinar cambios en diferentes vías reguladoras del BE, por lo cual se emplearon los cebadores ya descritos para la cuantificación de los genes del sistema 1) de las melanocortinas: *Pomc*, *AgRP* y *Npy*; 2) de la tiroides: *Dio2* y 3) del sistema de señalización TGR5: *Tgr5*. Como gen de referencia se usó *Nono* (proteína de unión a octámeros que contiene dominio no POU) (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021). Las secuencias de los cebadores empleados para el análisis son presentadas en la **Tabla 3**. El cDNA (ADN complementario) resultante de la transcripción (3 µL/500 ng) se utilizó para análisis de qPCR en 10 µL de solución de reacción, 5 µL de Master Mix (Affymetrix, products USB, EE. UU.), 0.9 µL cebador (Elim, 10 pM/µL) y 0.2 µL de agua libre de RNAsas (Mili Q). La qPCR se realizó durante 40 ciclos, utilizando Step One Plus Real Time PCR (Applied Biosystems) (Roque *et al.*, 2016). Los cambios en expresión en respuesta al tratamiento fueron determinados usando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores empleados para el análisis de expresión génica.

Nombre del gen	ID del gene	Iniciador directo (5'-3')	Iniciador de reversa (5'-3')
<i>Nono</i>	NM_023144	CTGTCTGGTGCATTCTGAACCTAT	AGCTCTGAGTTCATTTTCCCATG
<i>Pomc</i>	NM_008895	TGGGCGAGCTGATGACCT	GCCGACTGTGAAATCTGAAAGG
<i>Npy</i>	NM_023456	CCCCAGAACAAGGCTTGAAG	TTGGAAAAGTCGGGAGAACAA
<i>AgRP</i>	NM_007427	CTTTGGCGGAGGTGCTAGAT	AGGACTCGTGCAGCCTTACAC
<i>Tgr5</i>	NM_174985	CCTTTCCCTGCTTGCCAAT	CCGGAGTGGCTGCAACAC
<i>Dio2</i>	NM_13371	CCACCTGACCACCTTTCCTACT	TGGTTCCGGTGCTTCTTAAC

6. Verificación del efecto del tratamiento central con KF sobre la actividad física, el estrés y la ansiedad

6.1. Prueba de campo abierto

Los animales fueron sometidos a 24 horas de ayuno, para posteriormente ser inyectados i.c.v. con 5 µg de KF (n=8), en caso del grupo vehículo se usó una inyección i.c.v. con 1µL de DMSO (n=8). Una hora después de la inyección i.c.v. se colocaron en el centro del campo con un fondo cuadriculado y paredes oscuras con las medidas 60 cm de largo x 60 cm de ancho x 30 cm de altura. Los ratones dentro del campo abierto fueron grabados con ayuda de una webcam durante 10 minutos, los videos obtenidos posteriormente fueron analizados con el programa ANY-maze (Stoelting Company, E.E.U.U.).

6.2. Prueba de consumo de alimento en un ambiente novedoso

Los ratones que fueron sometidos a la prueba del campo abierto e inyectados i.c.v. previamente con 5 µg de KF (n=8) o DMSO (n=8), se colocaron en un segundo campo con fondo cuadriculado y paredes oscuras con las medidas 60 cm de largo x 60 cm de ancho x 30 cm de altura, en el cual se colocó una porción de alimento (pizza) al centro del campo, el cual conto con una iluminación extra de 40 lúmenes respecto a la luz ambiental, esto con ayuda de lampara Olympus LG-PS2 (Olympus corporation, Japón). Los animales se colocaron en la esquina inferior del campo al inicio de la prueba. Posteriormente se grabó el

comportamiento de los sujetos de prueba durante 5 minutos los videos obtenidos posteriormente fueron analizados con el programa ANY-maze (Stoelting Company, E.E.U.U.). También se evaluó el consumo de alimento en el campo (consumo de alimento en un ambiente novedoso) y el consumo en la caja de alojamiento (consumo de alimento en un ambiente familiar).

7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando las pruebas: 1) t de Student para la comparación de medias entre dos grupos y 2) análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para comparar grupos considerando los factores tratamiento y tiempo (TSI). Valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados como significativos. Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico GraphPad Prism 6 (La Jolla, California, EE. UU).

RESULTADOS

1. Inducción de la obesidad

Para la inducción de la obesidad, 28 ratones de la cepa C57BL/6J fueron alimentados con una dieta CAF (la composición está representada en las **Tabla 1** y **Tabla 2**), durante 14 semanas. Durante ese tiempo se midió el PC semanalmente. Como se esperaba, los datos obtenidos mostraron un aumento de PC semanal constante hasta llegar al doble de su peso inicial. (**Figura 7A**). Los pesos después de las catorce semanas de inducción fueron significativamente mayores al peso inicial (**Figuras 7B** y **7C**).

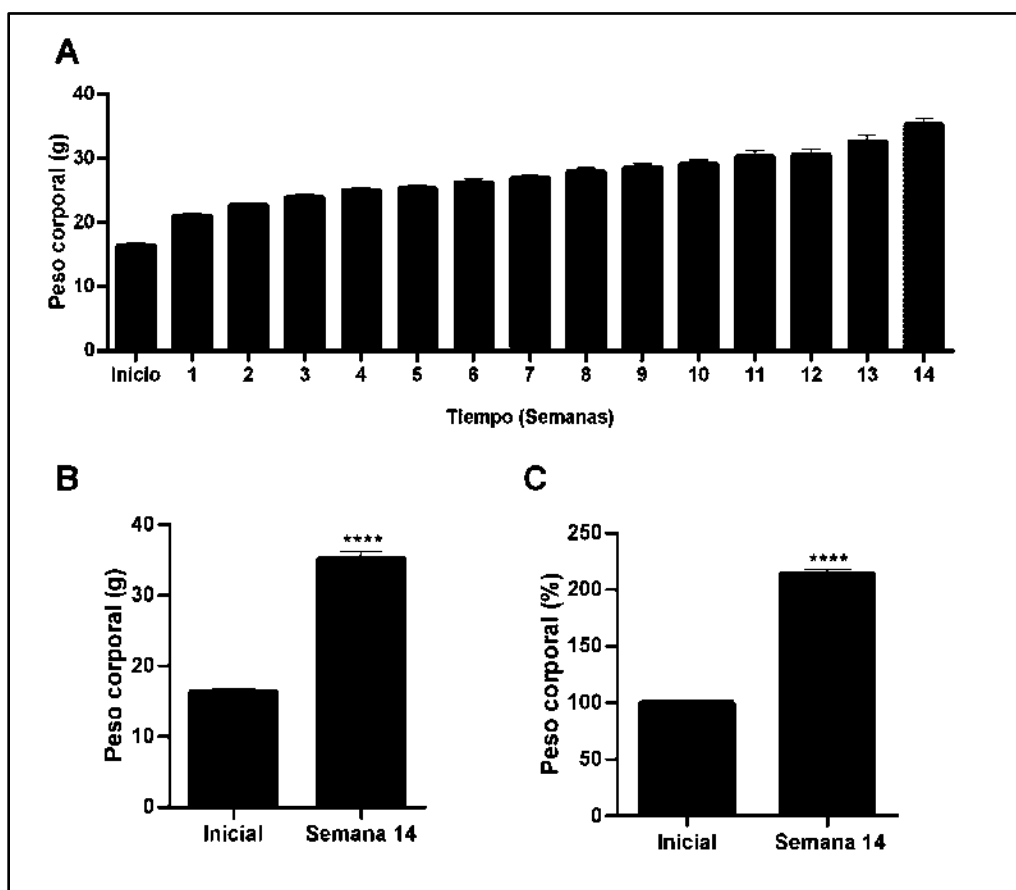


Figura 7. Inducción de la obesidad. Ratones de 8 semanas de edad fueron alimentados con dieta CAF durante 14 semanas, mostrando un incremento prácticamente del doble de su peso inicial (A). Se evaluó el PC inicial versus el PC a la semana catorce, donde se observó un aumento significativo (B). El cambio de PC en porcentaje con respecto al PC inicial también fue calculado (C). $n=28$, los datos se analizaron usando la prueba estadística t de student, **** $p<0.0001$.

2. Verificación del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre el BE

El BE es sumamente complejo en su regulación. A grandes rasgos, el fenotipo de éste involucra la cantidad de calorías consumidas y la capacidad del organismo de responder a ellas. Uno de los parámetros que cambia al tener un BE positivo es la ganancia de PC, por lo cual este parámetro fue evaluado. De igual forma se evaluó el CA, pues éste refleja la cantidad de calorías consumidas y cómo el organismo responde a ella. En conjunto, estos dos parámetros reflejan la eficiencia alimentaria, por lo cual en el presente estudio evaluamos dichos parámetros para verificar el estado energético de ratones sometidos a 24 horas de ayuno y posteriormente tratados i.c.v. con 5 μ g de KF contenidos en 1 μ L de DMSO o bien 1 μ L de DMSO sin KF (vehículo).

2.1 Evaluación del tratamiento i.c.v. agudo con kaempferol sobre el PC

Para verificar el efecto del tratamiento central con KF sobre el BE, se midió el cambio en el PC. Interesantemente, en el cambio del PC se observa una disminución significativa de ganancia de peso en los animales tratados con KF en comparación con el grupo vehículo (**Figura 8A**). En términos porcentuales, el grupo que recibió solamente el vehículo ganó alrededor de 5.5% de PC durante 24 h de realimentación (**Figura 8B**). La ganancia de PC en los ratones tratados con KF fue significativamente reducida (alrededor de 2.7%).

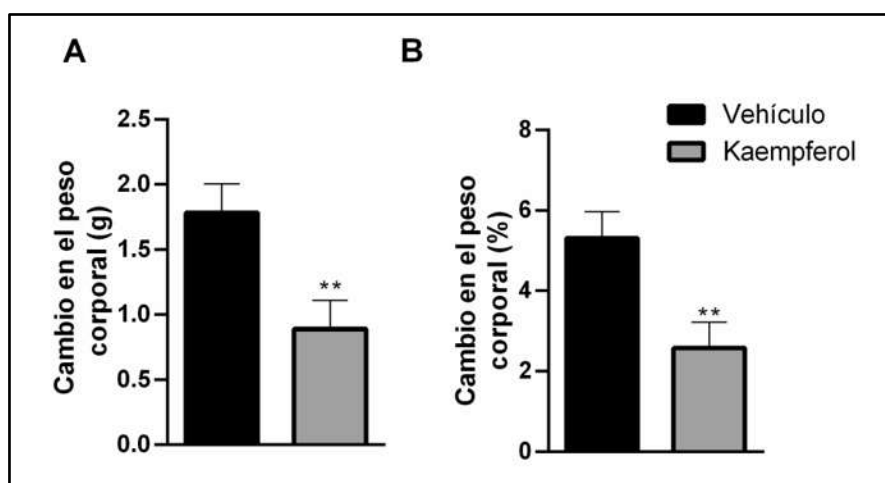


Figura 8. Evaluación del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre el PC. Los animales con 24 h de ayuno fueron tratados con 5 μ g de KF y se determinó el cambio de PC en gramos (A) y en porcentaje (B). n=13 para el grupo KF y n=14 para el grupo vehículo. Los datos fueron analizados con una prueba t de Student. **p < 0.01.

2.2 Evaluación del efecto agudo del tratamiento i.c.v. de kaempferol sobre el CA y la eficiencia alimentaria

De igual forma, se midió el CA, en el cual se observó que el tratamiento con KF no cambió el CA respecto al grupo vehículo en ninguno de los tiempos en que se midió (1 h, 2 h, 4 h y 24 h post tratamiento) (**Figura 9A**). El CA acumulado en 24 horas después del tratamiento no muestra cambios significativos en los ratones inyectados con KF respecto al grupo vehículo (**Figura 9B**). La preferencia alimentaria no muestra cambios significativos entre ambos grupos (KF versus vehículo); ambos grupos prefieren en su mayoría pizza y en menor cantidad la dieta estándar (**Figura 9C**). La eficiencia alimentaria mostró una disminución significativa en los animales tratados con KF (**Figura 9D**). Estos datos sugieren que el cambio en el peso corporal se debe a una disminución de la eficiencia alimentaria.

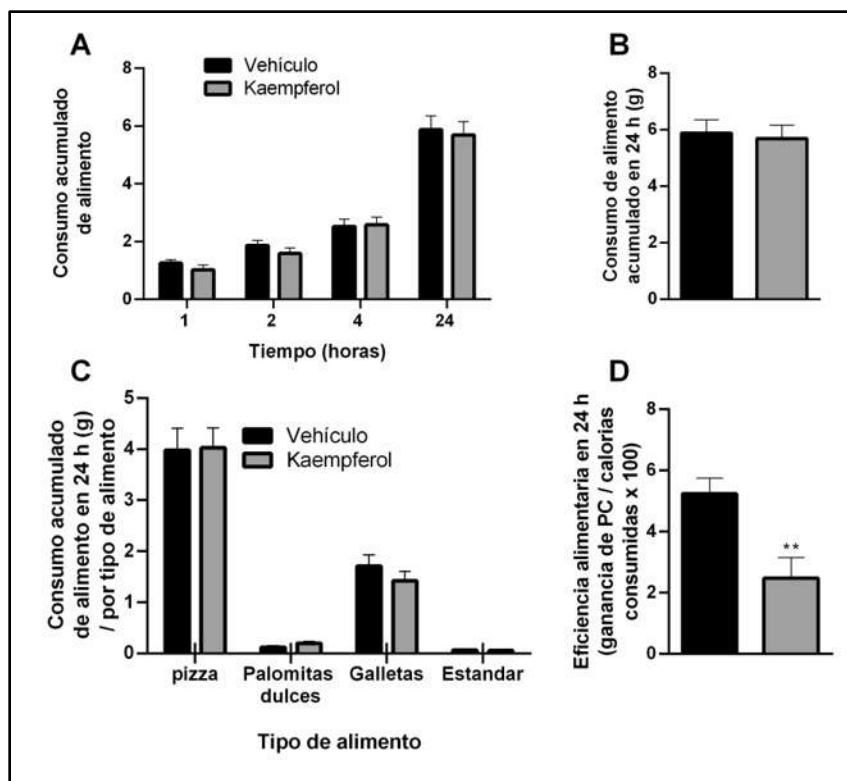


Figura 9. Efecto del tratamiento agudo i.c.v. con KF sobre el CA y la eficiencia alimentaria. Los ratones sometidos a 24 horas de ayuno fueron inyectados con 5 μ g de KF y realimentados con una dieta CAF. El CA acumulado fue determinado a las 1, 2, 4 y 24 h (A). El consumo acumulado en 24 h es presentado en (B). En el panel (C) se presentan las preferencias alimenticias de los animales tratados con KF y el vehículo. La eficiencia alimentaria fue calculada y presentada en el panel (D). n=13 para el grupo KF y n=14 para el vehículo. Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías (A), ANOVA de una vía (C) y una prueba t de Student. (B y D). **p < 0.01.

3. Evaluación del efecto agudo de la administración i.c.v. de KF sobre la sensibilidad a la insulina y la glucemia

Una de las alteraciones en parámetros bioquímicos que se presentan durante la obesidad es la elevación de glucosa en sangre y una disminución en la sensibilidad a la insulina, alteraciones relacionadas con la DT2. Por lo anterior verificamos si el tratamiento agudo con KF tiene efecto sobre dichos parámetros. Los datos del análisis no mostraron un cambio sobre la prueba de sensibilidad a la insulina (**Figura 10A y 10B**). De igual forma, la glucosa basal a diferentes horas de ayuno y en respuesta al tratamiento i.c.v. con KF no mostró diferencias significativas entre los grupos (**Figura 10C y 10D**).

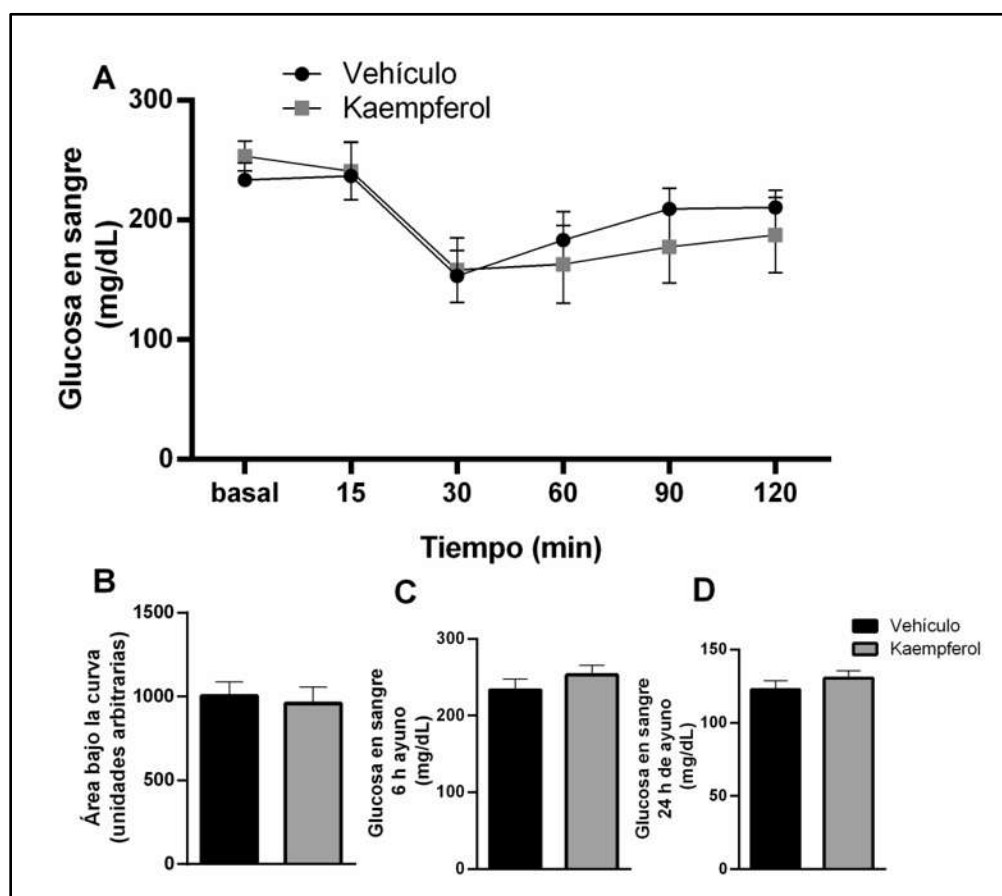


Figura 10. Evaluación del efecto agudo de la administración i.c.v. de KF sobre la sensibilidad a la insulina y la glucemia en ayuno. Ratones en 6 horas de ayuno fueron administrados con 5 μ g de KF de manera i.c.v. disuelto en DMSO. Posteriormente se inyectó insulina (0.75 U/kg) y se evaluaron los niveles de glucosa en sangre en diferentes tiempos (A). El área bajo la curva de los datos obtenidos es presentada en (B). En (C) y (D) se presentan los niveles de glucosa en sangre en ratones con 6 y 24 de ayuno, respectivamente, y tratados con KF. n=8 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con una prueba ANOVA de dos vías (A) y t de Student (B, C y D).

4. Análisis del efecto del tratamiento agudo i.c.v. con kaempferol sobre la expresión génica de marcadores de la regulación hipotalámica del BE

4.1. Análisis del efecto del tratamiento con kaempferol sobre la expresión génica del sistema de las melanocortinas en el hipotálamo

Para analizar el efecto de un tratamiento central con KF sobre la expresión de genes reguladores del BE dependientes del sistema de las melanocortinas, se analizó la expresión de los genes *Pomc*, *Npy* y *Agrp*. Los datos obtenidos por qPCR no mostraron efectos sobre la expresión relativa ni de *Pomc* (**Figura 11A**), ni de *Npy* (**Figura 11B**) ni de *Agrp* (**Figura 11C**). Estos datos nos sugieren que KF no actúa sobre el sistema de las melanocortinas, lo cual coincide con la ausencia de efectos sobre el CA.

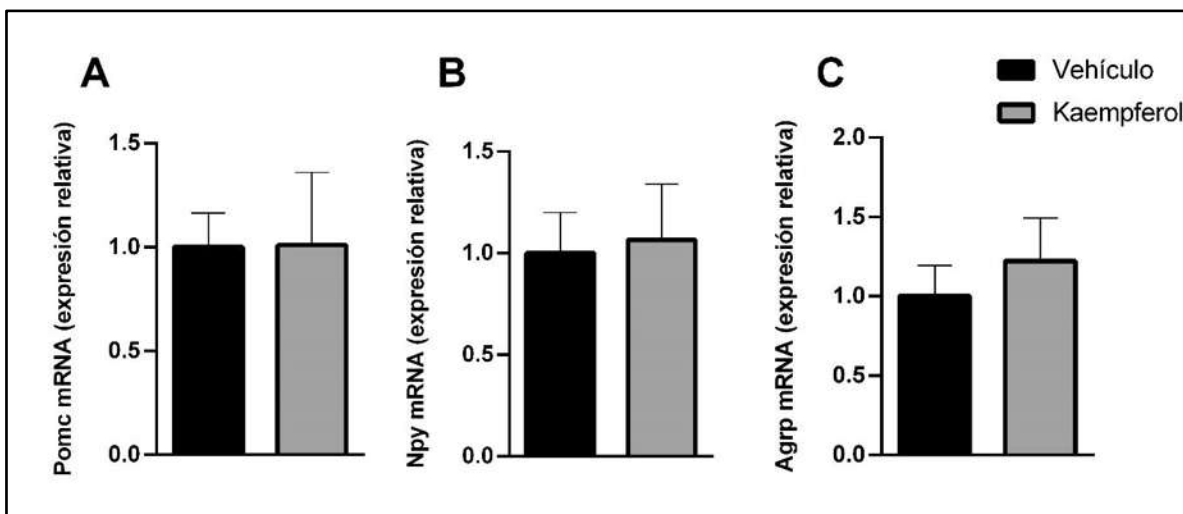


Figura 11. Análisis del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre el sistema de las melanocortinas. Ratones con 24 horas de ayuno, fueron inyectados con 5 μ g de KF de manera i.c.v. y 2 horas post tratamiento se realizó la eutanasia de estos. Los datos presentan la expresión relativa del mRNA de *Pomc* (A), de *Npy* (B) y de *Agrp* (C). n=6 animales/grupo. Los datos fueron analizados con una prueba t de Student.

4.2. Análisis del efecto agudo del tratamiento con KF sobre la expresión génica de la vía TGR5 / DIO2 en el hipotálamo

La vía regulada por las sales biliares ha despertado un gran interés para su investigación, ya que recientemente se demostró que el receptor TGR5 se expresa en el hipotálamo, donde ejerce efectos sobre BE, promoviendo una inducción del gasto energético. Dicho esto, en este

estudio nos interesó demostrar la capacidad de KF de modular esta vía intracelular. Los resultados muestran que el tratamiento i.c.v. con KF aumenta significativamente la expresión de *Tgr5* en el hipotálamo (**Figura 12A**). Interesantemente, el tratamiento también aumentó la expresión de *Dio 2* (**Figura 12B**). Los datos obtenidos sugieren que KF actúa regulando positivamente la vía intracelular que relaciona TGR5 y vías abajo DIO2, promoviendo un BE negativo.

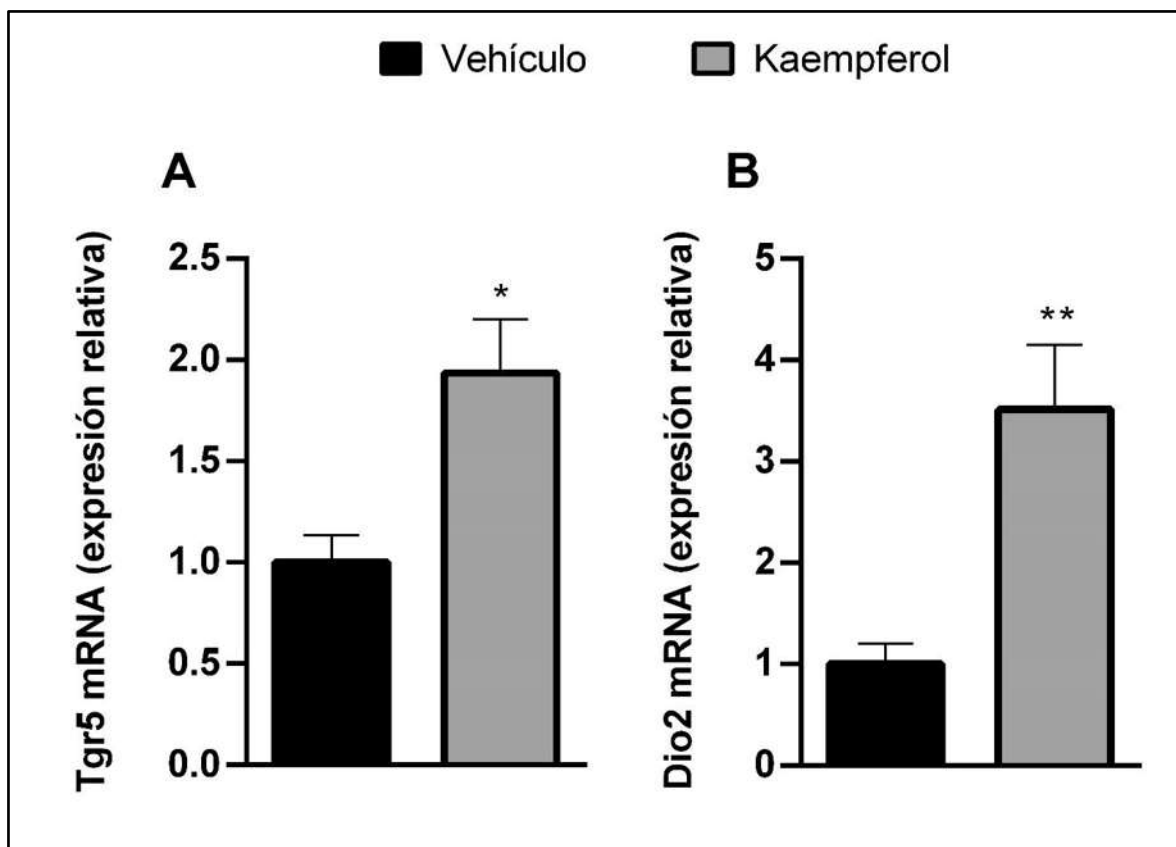


Figura 12. Análisis del efecto agudo del tratamiento i.c.v. con KF sobre la vía TGR5 / DIO2 en el hipotálamo. Ratones con 24 horas de ayuno, fueron inyectados con 5 μ g de KF de manera i.c.v. y 2 horas post tratamiento se realizó la eutanasia de estos. Los datos obtenidos muestran un aumento significativo en la expresión relativa de mRNA de *Tgr5* en el grupo KF en comparación con el grupo vehículo (A). El tratamiento también aumentó la expresión del mRNA de *Dio2* de manera significativa en el grupo tratado con dicho flavonoide respecto al grupo vehículo (B). n=6 animales/grupo. Los datos fueron analizados con una prueba t de Student. *p<0.05, **p<0.01.

5. Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre parámetros de actividad física, estrés y ansiedad

5.1. Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre la actividad física

Los ratones tratados con KF no mostraron cambios significativos en los parámetros de la velocidad media, velocidad máxima y la distancia recorrida respecto a los ratones vehículos inyectado con DMSO (**Tabla 4**). Interesantemente en el tiempo de movilidad de los animales tratados con KF fue significativamente más alto comparado con el grupo vehículo, por consiguiente, el tiempo de inmovilidad disminuyó de manera significativa en grupo KF versus el grupo vehículo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre la actividad física en ratones obesos.

Parámetro	Vehículo n=8	Kaempferol n=8	Valor de p
Velocidad media (m/s)	94.125 ± 6.48	109 ± 7.12	0.1446
Velocidad máxima (m/s)	594.25 ± 27.34	658.13 ± 51.54	0.2921
Distancia recorrida (m)	56381.12 ± 3882	65270.12 ± 4275	0.1460
Tiempo de movilidad (s)	415.11 ± 12.32	455.81 ± 13.95*	0.0116
Tiempo de inmovilidad (s)	183.67 ± 13.20	142.94 ± 13.92*	0.0109

5.2. Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 µg de KF sobre el estrés y la ansiedad

El estrés puede afectar el comportamiento normal de los ratones, por lo cual se propuso evaluar este parámetro en la prueba del campo abierto. Lo anterior con la finalidad de descartar que el cambio en el PC esté dado por un aumento en el estrés de los ratones tratados con KF. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que los ratones con el tratamiento agudos i.c.v. con KF realizaron significativamente más entradas a la zona centro, duran mayor tiempo en la zona media, de igual manera realizan un número mayor de entradas a la zona media e interesantemente el tiempo de estos ratones en la zona periférica (zona cerca de las paredes) es significativamente menor a los ratones del grupo vehículo (**Tabla 5**). Esto

sugiere que los cambios mostrados en el cambio de peso y la eficiencia alimentaria no está relacionado con un incremento en el estrés, pues de hecho presentan una reducción del comportamiento relacionado con este.

En la prueba de alimentación en un ambiente novedoso se encontró una tendencia a un consumo alimento mayor en los ratones tratados con KF ($p=0.0900$), respecto a los animales del grupo vehículo (**Tabla 5**). Sin embargo, no se mostraron cambios significativos en los otros parámetros. Esto sugiere que los ratones con KF tienden a ser menos ansiosos que los ratones vehículo.

Tabla 5. Efectos agudos de la administración i.c.v. de 5 μ g de KF sobre el estrés y la ansiedad en ratones obesos.

Parámetro	Vehículo n=8	Kaempferol n=8	Valor de p
Entradas zona centro	5.25 \pm 0.65	11.62 \pm 1.13**	0.002
Tiempo en zona centro (s)	9.74 \pm 2.12	13.85 \pm 1.92	0.1720
Entradas zona media	22.62 \pm 3.82	36.86 \pm 4.36*	0.0275
Tiempo en zona media (s)	26.83 \pm 5.74	42.75 \pm 3.29*	0.0305
Entradas periferia	17.12 \pm 3.51	25.75 \pm 3.38	0.0988
Tiempo en zona periférica (s)	562.17 \pm 6.67	542.14 \pm 4.76*	0.0284
Consumo de alimento ambiente novedoso (g)	0.10 \pm 0.02	0.15 \pm 0.02	0.0900
Consumo de alimento ambiente familiar (g)	0.10 \pm 0.04	0.24 \pm 0.05	0.1689
Consumo de alimento total (g)	0.27 \pm 0.05	0.40 \pm 0.07	0.1310
Latencia a realimentación (s)	25.7 \pm 6.28	17.48 \pm 4.99	0.1437
Entradas al centro	11.25 \pm 0.94	14.71 \pm 2.06	0.1331
Tiempo en el centro (s)	37.61 \pm 8.49	67.12 \pm 12.94	0.1658

DISCUSIÓN

Actualmente la obesidad representa el principal problema de salud pública a nivel mundial, pues se estima que en el mundo existen más de 1900 millones de personas con sobrepeso o un grado de obesidad (OMS, 2021). Parece ser que este problema lejos de disminuir va en aumento año con año, pese a los intentos gubernamentales de frenar dicho padecimiento. Se estima que países como Estados Unidos de Norteamérica y México aumenten su número de personas con este padecimiento en más de 40% en los próximos años (OCDE, 2018).

La obesidad es definida como una acumulación anormal o excesiva de tejido graso que puede ser perjudicial para la salud (OMS, 2021). Esta acumulación de grasa es más que un problema estético, pues se sabe que está relacionada con una gran cantidad de enfermedades como cardiopatías, hipertensión arterial, enfermedades pulmonares, trastornos metabólicos, algunos tipos de cáncer y en más de un 90% con DT2. Dichas patologías representan en su conjunto la principal causa de muerte a nivel mundial por enfermedades no transmisibles (Carbone *et al.*, 2017; Galicia-Negrete & Falfán-Valencia, 2017; Kawarazaki & Fujita, 2016; Kolb *et al.*, 2016). El comienzo de la obesidad se da por la ruptura del BE, es decir, se quebranta la capacidad del organismo de metabolizar correctamente las calorías consumidas en la dieta (Dorfman & Thaler, 2015; Farias *et al.*, 2017). El BE consta de una regulación compleja, donde nutrientes provenientes de la dieta y hormonas secretadas en la periferia por algunos órganos como el estómago, el páncreas y el tejido adiposo son detectados a nivel central, más en concreto en el ARC del hipotálamo (Schaeffer *et al.*, 2014). En esta estructura convergen una serie de sistemas que regulan dicho balance energético, como el sistema de las melanocortinas, el cual consta de poblaciones neuronales encargadas de aumentar el gasto energético y aumentar la sensación de saciedad (POMC), y otra población antagonista que disminuye el gasto energético (AGRP/NPY) (Derghal *et al.*, 2017). Recientemente, se demostró la presencia del receptor TGR5 en el hipotálamo, así como la participación de éste en la regulación del BE (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021). De manera, interesante, la activación de este receptor estimula vías abajo la expresión de *Dio2*, un transcrito que codifica la enzima DIO2; esta última cataliza la conversión de T4 a T3, forma bioactiva de la hormona de la tiroides. La T3 estimula la termogénesis, un mecanismo de disipación de

energía, a través de la estimulación por nervios del sistema simpático de BAT y WAT (Guo *et al.*, 2016; López *et al.*, 2013; Vernia *et al.*, 2013).

El consumo de dietas altas en grasas y azúcares refinados es fundamental para la ruptura de balance energético, ya que dichas dietas generan un estado crónico de inflamación de bajo grado, tanto a nivel periférico como central (Thaler *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que a nivel central las dietas altas en grasas, sobre todo ricas en ácidos grasos de cadena larga, elevan la cantidad de células microgliales con un fenotipo proinflamatorio. Lo anterior sucede incluso antes de presentar un fenotipo obeso, por lo cual se ha establecido que la activación de estas células es fundamental para el desarrollo de la obesidad (Dorfman & Thaler, 2015; André *et al.*, 2017). Esta inflamación crónica desequilibra el BE, a través de varios mecanismos, como la resistencia a la leptina y la resistencia a la insulina. Sin embargo, el mecanismo intracelular por el cual disminuye la actividad de los sistemas reguladores del balance energético aún no se ha dilucidado por completo (Seong *et al.*, 2019).

Compuestos de origen vegetal e inclusive fúngicos como los terpenos, antocianinas, carotenoides, terpenoides, flavonoides, etc., han demostrado tener propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antiobesogénicas, colocándolos como una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de la obesidad y sus enfermedades relacionadas (Lacerda *et al.*, 2022; Mierziak *et al.*, 2014). El KF es un flavonoide, de tipo flavonol, que ha sido estudiado para el tratamiento de varios padecimientos, entre ellos los desórdenes metabólicos (Ren *et al.*, 2019). Con base en lo anterior, ha despertado un interés particular para ser estudiado como un potencial agente antiobesogénico. Dados estos antecedentes, nuestro equipo de trabajo evaluó el efecto de la administración central de KF sobre el BE en ratones obesos. El estudio encontró que el KF promueve un BE negativo (Romero-Juárez *et al.*, 2021).

En este estudio evaluamos la capacidad del KF de modular centralmente 1) el BE, 2) la homeostasis de la glucosa, 3) la expresión de genes involucrados en la regulación del BE, además de 4) la actividad física en ratones obesos alimentados con una dieta de CAF. Dicho estudio mostró una disminución significativa en la ganancia de PC y de la eficiencia alimentaria, con un tratamiento agudo de KF a una dosis de 5 µg inyectados centralmente

(i.c.v.). Dichos resultados replican los datos obtenidos y publicados anteriormente por el equipo de trabajo, en el cual un tratamiento i.c.v. agudo mostró una disminución significativa en la ganancia de PC y una reducción de la eficiencia alimentaria (Romero-Juárez *et al.*, 2021). A pesar de haberse usado dietas obesogénicas diferentes (HFD en el estudio referido), los resultados coinciden, indicando que el KF promueve un BE negativo en condiciones de un exceso de calorías en la dieta. Otros estudios han demostrado el efecto preventivo de este flavonoide al alimentar ratones con dieta HFD adicionada con 200 mg/kg de KF durante 8 semanas. Dicho tratamiento mostró una atenuación en la ganancia de peso (T. Wang *et al.*, 2020); sin embargo, estos resultados discrepan de lo observado por Alkhalidy *et al.*, en el 2018, donde no se obtuvo un cambio de peso en un tratamiento de 6 semanas con KF a una dosis 50 mg/kg/día (Alkhalidy *et al.*, 2018). Las diferencias se debieron probablemente a la diferente dosis usada en el último estudio, la cual puede ser baja si consideramos que fue administrada por vía oral y se sabe que este tipo de fitoquímicos sufre una absorción marginal a través de esta vía de administración (Barve *et al.*, 2009). Cabe mencionar que tanto Alkhalidy *et al.* (2018) como Wang *et al.* (2020) usaron un modelo de dieta HFD, lo que sugiere que los efectos del KF sobre ratones obesos no dependen de la dieta, mientras ésta sea alta en grasas saturadas.

En el presente estudio, el CA se mantuvo sin cambio alguno en ambos grupos, esto coincide con los datos reportados por nuestro equipo anteriormente (Romero-Juárez *et al.*, 2021). Por otro lado, la eficiencia alimentaria tuvo una disminución significativa, estos datos sugieren que la atenuación de la ganancia de PC es debida a un incremento en el gasto energético y no a una disminución en el consumo de alimento. Los mismos resultados fueron observados en el estudio previo que se refiere (Romero-Juárez *et al.*, 2021).

Una de las afectaciones que se ve en la obesidad es un alza en las concentraciones de glucosa sanguínea, así como una resistencia a la insulina. Por ello se estableció un protocolo para evaluar cambios en la respuesta a la insulina en ratones tratados centralmente con KF. El tratamiento no mostró efecto en dicha prueba, contrastando con los resultados observados en un tratamiento crónico a una dosis de 0.5 mg/kg i.p., donde se observó una fuerte tendencia al aumento de la sensibilidad a la insulina, así como a la reducción de la glucosa en ayuno

(Romero-Juárez *et al.*, 2021). Esta tendencia es similar a la reportada por Alkhalidy *et al.*, en el 2018, pero difiere del tratamiento preventivo donde sí se muestra una mejora significativa en la sensibilidad a la insulina (Wang *et al.*, 2020). La ausencia de diferencia también puede explicarse porque la prueba en este trabajo fue de manera aguda, sugiriendo que para alcanzar efectos se requiere de un periodo crónico de tratamiento.

La promoción de un BE negativo sin cambios en el consumo de alimento sugiere una inducción del gasto energético, un proceso regulado críticamente por el ARC. Dentro de los actores que promueven el gasto energético tenemos al sistema de las melanocortinas. Para determinar si los efectos de la administración i.c.v. del KF dependen de la activación de dicha vía, en este trabajo se analizó la expresión de *Pomc*, *Npy* y *Agrp*. El tratamiento con KF no mostró cambios sobre la expresión génica de ninguno de los tres neuropéptidos. La ausencia de cambios es consistente con el resultado obtenido en el análisis del CA, el cual no fue alterado por el tratamiento. La POMC es conocida por aumentar el gasto energético y disminuir la sensación del apetito desde una perspectiva clásica, sin embargo, actualmente se propone que la POMC mantiene una heterogeneidad a diferentes estímulos (Saucisse *et al.*, 2021), e inclusive en ciertas condiciones puede estimular el CA (Koch *et al.*, 2015). Aunque no existen estudios con un enfoque antiobesogénico del KF a nivel del hipotálamo, en un estudio en un modelo de depresión donde administraron por vía oral (dieta) una dosis de 30 mg/kg/día de KF y quercetina, se observó que dicho tratamiento aumento la expresión de POMC (Park *et al.*, 2010), de igual forma esto coincide con otro estudio con otro flavonoide (Ibars *et al.*, 2017). Cabe mencionar que, a diferencia del presente trabajo, dichos estudios fueron de manera sub crónica. Aponte *et al.* (2011) mostró que para observar el efecto clásico de POMC, era preciso estimularlo más de 24 horas (Aponte *et al.*, 2011). La expresión de los péptidos antagonistas de POMC: AGRP y NPY, no se ve alterada pues dichos péptidos se expresan en condiciones de déficit calórico (ayuno), por lo cual esta población neuronal induce el apetito y disminuyen el gasto energético (Bunner *et al.*, 2020). Los efectos de compuestos de origen vegetal sobre neuronas AGRP / NPY son escasos; sin embargo, Ibars *et al.*, en el 2017, mostró que los flavonoides proantocianidinas aumentan la expresión de estos reguladores del balance energético en ratones inducidos a obesidad por una dieta de cafetería (Ibars *et al.*, 2017). Los datos obtenidos en este estudio están en concordancia con

la literatura antes mencionada, pues muestran que el tratamiento agudo i.c.v. con KF no modifica los componentes del sistema de las melanocortinas, por lo cual el efecto sobre el BE involucra otras vías intracelulares en el hipotálamo.

Dada la ausencia de respuesta en la expresión del sistema de las melanocortinas en respuesta al tratamiento con KF, se exploraron otras vías. El receptor a sales biliares TGR5, representa una diana terapéutica prometedora e innovadora que se expresa altamente en una gran cantidad de tejidos (Watanabe *et al.*, 2006). Recientemente se ha demostrado que TGR5 se expresa en el hipotálamo (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021). Dicha estructura el TGR5 participa en la regulación del BE, lo cual fue demostrado por el uso de agonistas selectivos de este receptor y por la inactivación del gen. Mientras el agonista sintético (CCDC) de TGR5 promovió una pérdida de PC, la inactivación por siRNA llevó al desarrollo de obesidad. Además, la estimulación central de este receptor aumentó la termogénesis en el BAT y el WAT (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021). Se ha descrito que la estimulación de TGR5 estimula vías debajo a DIO2 dependiente de cAMP), un regulador del metabolismo energético que induce la termogénesis en ambos tejidos adiposos (Watanabe *et al.*, 2006. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que el tratamiento i.c.v. agudo con KF aumenta significativamente la expresión de TGR5. Cabe resaltar que un estudio demostró que un extracto de flavonoides totales de *Astragalus radix* aumentó la expresión de las proteínas de FXR y TGR5 (receptores de sales biliares) en hígado en un modelo de diabetes (Wang *et al.*, 2021), además varios compuestos de origen natural han demostrado un efecto agonista sobre TGR5 (Ding *et al.*, 2021; Sasaki *et al.*, 2017). También se ha demostrado que usando CCDC, agonista selectivo de TGR5, administrado vía i.c.v. aumenta la expresión de *Dio2* y *Ucp1* en tejidos adiposos, dicha interacción ha sido observada junto con la activación de la vía mTOR por varios grupos de investigación, dichos componentes son ampliamente conocidos por su participación reguladora en el BE (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021; Perino *et al.*, 2014; Watanabe *et al.*, 2006). El tratamiento agudo con KF a nivel central también promovió el aumento significativo de *Dio2*, lo cual coincide con los estudios antes mencionados, donde el KF aumentó la expresión de este gen en un cultivo celular, además de incrementar el consumo de oxígeno, traduciendo esto en un aumento del gasto energético (da-Silva *et al.*, 2007). Pese al papel termogénico de esta enzima, no se han realizado muchos

estudios para observar el efecto de los flavonoides sobre DIO2, por lo cual la información es limitada. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio demuestran que el KF administrado de manera aguda por vía i.c.v es capaz de regular al alza los genes *tgr5* y *Dio2*, lo cual establece que estos dos componentes del BE están estrechamente relacionados entre sí, además de que los efectos fenotípicos observados sobre la disminución de la ganancia de peso corporal y la eficiencia alimentaria pueden estar efectuados por la reactivación de esta vía TGR5 / DIO2. Es probable que la activación de dicha vía intracelular conduzca a un aumento de la termogénesis, a través de la activación simpática del BAT y el WAT, un proceso que ya ha sido demostrado (Castellanos-Jankiewicz *et al.*, 2021; López *et al.*, 2013); no obstante, estudios suplementarios deben ser realizados para probar dicha hipótesis.

Otro componente del gasto energético es la actividad física. En este trabajo verificamos el efecto del tratamiento i.c.v. con KF sobre la actividad física. Los resultados muestran que el KF administrado centralmente aumenta el tiempo de movilidad de ratones obesos, sugiriendo un aumento del gasto de energía. Los datos obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Shibuya y colaboradores en 2022, en donde evaluaron varios compuestos naturales entre ellos KF en un modelo de ratón con deficiencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD2) en musculo, este estudio mostro una mejora en la función motora de los ratones con deficiencia de SOD2 (Shibuya *et al.*, 2022). Sin embargo, los mecanismos por los cuales KF u otro polifenol puedan estar ejerciendo sus efectos a nivel central se desconocen, pues cabe mencionar que este estudio es pionero en evaluar el efecto de este polifenol a nivel central. Se puede hipotetizar que este efecto se debe a un incremento en la expresión de orexina (OX) en el hipotálamo, ya que se sabe que la poblaciones neuronales OX proyectan impulsos excitatorios al núcleo del rafe dorsal y este a su vez tienes proyecciones a la áreas de control motor, como: los ganglios basales, la corteza motora, el cerebelo y la medula espinal (Mavanji *et al.*, 2022). Sin embargo, se necesita de más estudios para esclarecer los mecanismos implicados en el efecto sobre la actividad física observado en este estudio.

El estrés y la ansiedad en animales de laboratorio puede causar un comportamiento erróneo, esto puede llevar a sesgos en la interpretación de los datos obtenidos, por lo cual se realizaron

dos pruebas experimentales para evaluar el estrés y la ansiedad en los ratones de este estudio. Los datos obtenidos descartan cualquier interferencia del estrés o ansiedad en los parámetros estudiados en este trabajo de investigación, ya que las pruebas de campo abierto y preferencia alimenticia en espacios novedosos así lo demuestran.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con el estudio previo de nuestro equipo de trabajo, el KF administrado i.c.v. de manera aguda produce una disminución en la ganancia de peso corporal y disminuye significativamente la eficiencia alimentaria, esto sin cambios en el consumo de alimento. El tratamiento agudo no modificó la sensibilidad a la insulina, pero en contraparte aumentó la actividad física. Los resultados sobre la expresión génica en respuesta al tratamiento con el KF, mostraron que KF interviene en la regulación de la expresión de los componentes del sistema de las melanocortinas. En cambio, el tratamiento con KF llevó al aumento de la expresión de la vía intracelular de *Tgr5 / Dio2*. Estos resultados apuntan a una activación de la vía TGR5 / DIO2, que inducen el gasto energético, promoviendo el BE negativo que conllevan, a su vez, a una reducción del PC. Sin embargo, se requieren de estudios adicionales para evaluar otros reguladores del metabolismo energético, de tal suerte que se obtenga una visión más amplia de los mecanismos intracelulares que KF pueda regular en el hipotálamo. La actividad regulatoria del KF sobre el metabolismo a nivel central, así los beneficios metabólicos asociados, demandan considerar su utilización como una potencial estrategia terapéutica para el tratamiento de la obesidad, desde una perspectiva de neuronutrición.

PERSPECTIVAS.

- 1.- Analizar el efecto del tratamiento i.c.v. de KF sobre reguladores termogénicos (*Dio2*, *Ucp1*, *Adrb1*, *Adrb2* y *Adrb3*) en BAT y WAT.
- 2.- Redactar el artículo original para someter a la revista *Nutritional Neuroscience* o *Brain Research*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, A., Luo, J., McMillan, R. P., Wang, Y., Zhen, W., Hulver, M. W., & Liu, D. (2018). Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, *58*, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.04.014>
- Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Yokoyama, M., Honda, M., Miyamoto, K., & Kaneko, S. (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*, *57*(8), 1071–1077. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.03.010>
- André, C., Guzman-Quevedo, O., Rey, C., Rémus-Borel, J., Clark, S., Castellanos-Jankiewicz, A., Ladeveze, E., Leste-Lasserre, T., Nadjar, A., Abrous, D. N., Laye, S., & Cota, D. (2017). Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. *Diabetes*, *66*(4), 908–919. <https://doi.org/10.2337/db16-0586>
- Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience*, *14*(3), 351–355. <https://doi.org/10.1038/nn.2739>
- Baltasar, A. (2001). *Obesidad y cirugía: Cómo dejar de ser obeso*. Arán Ediciones.
- Barve, A., Chen, C., Hebbar, V., Desiderio, J., Saw, C. L.-L., & Kong, A.-N. (2009). Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, *30*(7), 356–365. <https://doi.org/10.1002/bdd.677>

- Benfato, I. D., Moretto, T. L., de Carvalho, F. P., Barthichoto, M., Ferreira, S. M., Costa Júnior, J. M., Lazzarin, M. C., de Oliveira, F., Martinez, C., Prado de França Carvalho, C., & de Oliveira, C. A. M. (2017). Spontaneous physical activity and mediators of energy homeostasis in the hypothalamus of mice from 4 to 10 months of age. *Experimental Physiology*, *102*(11), 1524–1534. <https://doi.org/10.1113/EP086265>
- Bernal, J. (2015). Thyroid Hormones in Brain Development and Function. En *Endotext [Internet]*. MDText.com, Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285549/>
- Blundell, J. E., Gibbons, C., Caudwell, P., Finlayson, G., & Hopkins, M. (2015). Appetite control and energy balance: Impact of exercise: Appetite control and exercise. *Obesity Reviews*, *16*, 67–76. <https://doi.org/10.1111/obr.12257>
- Bonfim, T. H. F. do, Tavares, R. L., de Vasconcelos, M. H. A., Gouveia, M., Nunes, P. C., Soares, N. L., Alves, R. C., de Carvalho, J. L. P., Alves, A. F., Pereira, R. de A., Cardoso, G. A., Silva, A. S., & Aquino, J. de S. (2021). Potentially obesogenic diets alter metabolic and neurobehavioural parameters in Wistar rats: A comparison between two dietary models. *Journal of Affective Disorders*, *279*, 451–461. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.10.034>
- Bowtell, J., & Kelly, V. (2019). Fruit-Derived Polyphenol Supplementation for Athlete Recovery and Performance. *Sports Medicine (Auckland, N.z.)*, *49*(Suppl 1), 3–23. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0998-x>
- Bradley, D., Liu, J., Blaszczak, A., Wright, V., Jalilvand, A., Needleman, B., Noria, S., Renton, D., & Hsueh, W. (2018). Adipocyte DIO2 Expression Increases in Human

- Obesity but Is Not Related to Systemic Insulin Sensitivity. *Journal of Diabetes Research*, 2018, 2464652. <https://doi.org/10.1155/2018/2464652>
- Bunner, W., Landry, T., Laing, B. T., Li, P., Rao, Z., Yuan, Y., & Huang, H. (2020). ARCAgRP/NPY Neuron Activity Is Required for Acute Exercise-Induced Food Intake in Un-Trained Mice. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00411>
- Carbone, S., Lavie, C. J., & Arena, R. (2017). Obesity and Heart Failure: Focus on the Obesity Paradox. *Mayo Clinic Proceedings*, 92(2), 266–279. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.11.001>
- Caron, A., & Richard, D. (2017). Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1391(1), 35–53. <https://doi.org/10.1111/nyas.13263>
- Castellanos-Jankiewicz, A., Guzmán-Quevedo, O., Fénelon, V. S., Zizzari, P., Quarta, C., Bellocchio, L., Tailleux, A., Charton, J., Fernandois, D., Henricsson, M., Piveteau, C., Simon, V., Allard, C., Quemener, S., Guinot, V., Hennuyer, N., Perino, A., Dubeau, A., Maitre, M., ... Cota, D. (2021). Hypothalamic bile acid-TGR5 signaling protects from obesity. *Cell Metabolism*, 33(7), 1483-1492.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.04.009>
- Cena, H., Chiovato, L., & Nappi, R. E. (2020). Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(8), e2695–e2709. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa285>

- Chávez-Talavera, O., Tailleux, A., Lefebvre, P., & Staels, B. (2017). Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*, *152*(7), 1679-1694.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.055>
- Da Fonseca Cardoso, L. M., De Souza Monnerat, J. A., De Medeiros Silva, I. W. S., Da Silva Ferreira Fiochi, R., Da Matta Alvarez Pimenta, N., Mota, B. F., Dolisnky, M., Do Carmo, F. L., Barroso, S. G., Da Costa, C. A. S., Stockler-Pinto, M. B., & De Souza Rocha, G. (2021). Beverages Rich in Resveratrol and Physical Activity Attenuate Metabolic Changes Induced by High-Fat Diet. *Journal of the American College of Nutrition*, *40*(6), 485–495. <https://doi.org/10.1080/07315724.2020.1805374>
- da-Silva, W. S., Harney, J. W., Kim, B. W., Li, J., Bianco, S. D. C., Crescenzi, A., Christoffolete, M. A., Huang, S. A., & Bianco, A. C. (2007). The Small Polyphenolic Molecule Kaempferol Increases Cellular Energy Expenditure and Thyroid Hormone Activation. *Diabetes*, *56*(3), 767–776.
- De Jonghe, B. C., Hayes, M. R., & Bence, K. K. (2011). Melanocortin control of energy balance: Evidence from rodent models. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(15), 2569–2588. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0707-5>
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., Saad, M. J. A., & Velloso, L. A. (2005). Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology*, *146*(10), 4192–4199. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1520>

- Derghal, A., Djelloul, M., Trouslard, J., & Mounien, L. (2017). The Role of MicroRNA in the Modulation of the Melanocortinergic System. *Frontiers in Neuroscience, 11*.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00181>
- Ding, L., Yang, Q., Zhang, E., Wang, Y., Sun, S., Yang, Y., Tian, T., Ju, Z., Jiang, L., Wang, X., Wang, Z., Huang, W., & Yang, L. (2021). Notoginsenoside Ft1 acts as a TGR5 agonist but FXR antagonist to alleviate high fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Acta Pharmaceutica Sinica. B, 11*(6), 1541–1554.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.038>
- Dorfman, M. D., & Thaler, J. P. (2015). Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity: *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity, 22*(5), 325–330.
<https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000182>
- Duboc, H., Taché, Y., & Hofmann, A. F. (2014). The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, 46*(4), 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2013.10.021>
- Dwarkasing, J. T., Marks, D. L., Witkamp, R. F., & van Norren, K. (2016). Hypothalamic inflammation and food intake regulation during chronic illness. *Peptides, 77*, 60–66.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.06.011>
- Dwarkasing, J. T., van Dijk, M., Dijk, F. J., Boekschoten, M. V., Faber, J., Argilès, J. M., Laviano, A., Müller, M., Witkamp, R. F., & van Norren, K. (2014). Hypothalamic food intake regulation in a cancer-cachectic mouse model. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 5*(2), 159–169. <https://doi.org/10.1007/s13539-013-0121-y>

- ENSANUT. (2021). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19. Resultados nacionales*. <https://www.insp.mx/novedades-editoriales/encuesta-nacional-de-salud-y-nutricion-2021-sobre-covid-19-resultados-nacionales>
- Farias, G., Netto, B. D. M., Bettini, S. C., Dâmaso, A. R., & de Freitas, A. C. T. (2017). Neuroendocrine regulation of energy balance: Implications on the development and surgical treatment of obesity. *Nutrition and Health*, 23(3), 131–146. <https://doi.org/10.1177/0260106017719369>
- Galicia-Negrete, G., & Falfán-Valencia, R. (2017). Mediadores de la respuesta inflamatoria en asma y su relación con obesidad. *Revista Alergia México*, 64(2), 198–205. <https://doi.org/10.29262/ram.v64i2.259>
- Gómez-Zorita, S., Lasa, A., Abendaño, N., Fernández-Quintela, A., Mosqueda-Solís, A., García-Sobreviela, M. P., Arbonés-Mainar, J. M., & Portillo, M. P. (2017). Phenolic compounds apigenin, hesperidin and kaempferol reduce in vitro lipid accumulation in human adipocytes. *Journal of Translational Medicine*, 15, 237. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1343-0>
- Guo, C., Chen, W.-D., & Wang, Y.-D. (2016). TGR5, Not Only a Metabolic Regulator. *Frontiers in Physiology*, 7, 646. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00646>
- Guruvaiah, P., Guo, H., Li, D., & Xie, Z. (2018). Preventive Effect of Flavonol Derivatives Abundant Sanglan Tea on Long-Term High-Fat-Diet-Induced Obesity Complications in C57BL/6 Mice. *Nutrients*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/nu10091276>
- Harpaz, E., Tamir, S., Weinstein, A., & Weinstein, Y. (2016). The effect of caffeine on energy balance. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0090>

- Hopkins, M., & Blundell, J. E. (2016). Energy balance, body composition, sedentariness and appetite regulation: Pathways to obesity. *Clinical Science*, *130*(18), 1615–1628. <https://doi.org/10.1042/CS20160006>
- Ibars, M., Ardid-Ruiz, A., Suárez, M., Muguerza, B., Bladé, C., & Aragonès, G. (2017). Proanthocyanidins potentiate hypothalamic leptin/STAT3 signalling and Pomc gene expression in rats with diet-induced obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, *41*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1038/ijo.2016.169>
- Jang, P.-G., Namkoong, C., Kang, G. M., Hur, M.-W., Kim, S.-W., Kim, G. H., Kang, Y., Jeon, M.-J., Kim, E. H., Lee, M.-S., Karin, M., Baik, J.-H., Park, J.-Y., Lee, K.-U., Kim, Y.-B., & Kim, M.-S. (2010). NF- κ B Activation in Hypothalamic Pro-opiomelanocortin Neurons Is Essential in Illness- and Leptin-induced Anorexia. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(13), 9706–9715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.070706>
- Kawarazaki, W., & Fujita, T. (2016). The Role of Aldosterone in Obesity-Related Hypertension. *American Journal of Hypertension*, *29*(4), 415–423. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpw003>
- Keihani, S., Hosseinpanah, F., Barzin, M., Serahati, S., Doustmohamadian, S., & Azizi, F. (2015). Abdominal obesity phenotypes and risk of cardiovascular disease in a decade of follow-up: The Tehran Lipid and Glucose Study. *Atherosclerosis*, *238*(2), 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.008>
- Keitel, V., Görg, B., Bidmon, H. J., Zemtsova, I., Spomer, L., Zilles, K., & Häussinger, D. (2010). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia*, *58*(15), 1794–1805. <https://doi.org/10.1002/glia.21049>

- Kim, J. D., Leyva, S., & Diano, S. (2014). Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00480>
- Koch, M., Varela, L., Kim, J. G., Kim, J. D., Hernandez, F., Simonds, S. E., Castorena, C. M., Vianna, C. R., Elmquist, J. K., Morozov, Y. M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M. A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M. O., Gao, X.-B., Diano, S., & Horvath, T. L. (2015). Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature*, 519(7541), 45–50. <https://doi.org/10.1038/nature14260>
- Kokkoris, P., & Pi-Sunyer, F. X. (2003). Obesity and endocrine disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 32(4), 895–914. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(03\)00078-1](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(03)00078-1)
- Kolb, R., Sutterwala, F. S., & Zhang, W. (2016). Obesity and cancer: Inflammation bridges the two. *Current opinion in pharmacology*, 29, 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.07.005>
- Kurnool, S., McCowen, K. C., Bernstein, N. A., & Malhotra, A. (2023). Sleep Apnea, Obesity, and Diabetes—An Intertwined Trio. *Current Diabetes Reports*, 23(7), 165–171. <https://doi.org/10.1007/s11892-023-01510-6>
- Lacerda, D. C., Urquiza-Martínez, M. V., Manhaes-de-Castro, R., Visco, D. B., Derosier, C., Mercado-Camargo, R., Torner, L., Toscano, A. E., & Guzmán-Quevedo, O. (2022). Metabolic and neurological consequences of the treatment with polyphenols: A systematic review in rodent models of noncommunicable diseases. *Nutritional Neuroscience*, 25(8), 1680–1696. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1891614>

- Lang, P., Hasselwander, S., Li, H., & Xia, N. (2019). Effects of different diets used in diet-induced obesity models on insulin resistance and vascular dysfunction in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55987-x>
- Liu, J., Wang, Y., & Lin, L. (2019). Small molecules for fat combustion: Targeting obesity. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(2), 220–236. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.09.007>
- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, 19(7), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>
- M. Calderon-Montano, J., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., & Lopez-Lazaro, M. (2011). A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4), 298–344. <https://doi.org/10.2174/138955711795305335>
- Mavanji, V., Pomonis, B., & Kotz, C. M. (2022). Orexin, serotonin, and energy balance. *Wires Mechanisms of Disease*, 14(1), e1536. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1536>
- McAninch, E. A., & Bianco, A. C. (2014). Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311(1), 77–87. <https://doi.org/10.1111/nyas.12374>
- Miean, K. H., & Mohamed, S. (2001). Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 3106–3112. <https://doi.org/10.1021/jf000892m>

- Mierziak, J., Kostyn, K., & Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, *19*(10), 16240–16265. <https://doi.org/10.3390/molecules191016240>
- OECD. (2019). *The Heavy Burden of Obesity: The Economics of Prevention*. OECD. <https://doi.org/10.1787/67450d67-en>
- Ortega, F. B., Ruiz, J. R., & Castillo, M. J. (2013). Actividad física, condición física y sobrepeso en niños y adolescentes: Evidencia procedente de estudios epidemiológicos. *Endocrinología y Nutrición*, *60*(8), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2012.10.006>
- Park, S.-H., Sim, Y.-B., Han, P.-L., Lee, J.-K., & Suh, H.-W. (2010). Antidepressant-like Effect of Kaempferol and Quercitrin, Isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *Experimental Neurobiology*, *19*(1), 30–38. <https://doi.org/10.5607/en.2010.19.1.30>
- Perino, A., Pols, T. W. H., Nomura, M., Stein, S., Pellicciari, R., & Schoonjans, K. (2014). TGR5 reduces macrophage migration through mTOR-induced C/EBP β differential translation. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(12), 5424–5436. <https://doi.org/10.1172/JCI76289>
- Piché, M.-E., Tchernof, A., & Després, J.-P. (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circulation Research*, *126*(11), 1477–1500. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316101>
- Pojednic, R., D'Arpino, E., Halliday, I., & Bantham, A. (2022). The Benefits of Physical Activity for People with Obesity, Independent of Weight Loss: A Systematic Review.

International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(9), 4981.

<https://doi.org/10.3390/ijerph19094981>

Ren, J., Lu, Y., Qian, Y., Chen, B., Wu, T., & Ji, G. (2019). Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(4), 2759–2776. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7886>

Ribeiro, S. M., Dos Santos Zirlene Adriana, Renata Juliana Da Silva, Eliana Louzada, José Donato Junior & Julio Tirapegui. (2007). *Leptina: Aspectos Sobre o Balanço Energético, Exercício Físico e Amenorréia do Esforço*. 14.

Romero-Juárez, P. A., Visco, D. B., Manhães-de-Castro, R., Urquiza-Martínez, M. V., Saavedra, L. M., González-Vargas, M. C., Mercado-Camargo, R., Aquino, J. de S., Toscano, A. E., Torner, L., & Guzmán-Quevedo, O. (2021). Dietary flavonoid kaempferol reduces obesity-associated hypothalamic microglia activation and promotes body weight loss in mice with obesity. *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 1–15. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.2012629>

Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017>

Saito, M., Matsushita, M., Yoneshiro, T., & Okamatsu-Ogura, Y. (2020). Brown Adipose Tissue, Diet-Induced Thermogenesis, and Thermogenic Food Ingredients: From Mice to Men. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 222. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00222>

- Sasaki, T., Mita, M., Ikari, N., Kuboyama, A., Hashimoto, S., Kaneko, T., Ishiguro, M., Shimizu, M., Inoue, J., & Sato, R. (2017). Identification of key amino acid residues in the hTGR5–nomilin interaction and construction of its binding model. *PLOS ONE*, *12*(6), e0179226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179226>
- Saucisse, N., Mazier, W., Simon, V., Binder, E., Catania, C., Bellocchio, L., Romanov, R. A., Léon, S., Matias, I., Zizzari, P., Quarta, C., Cannich, A., Meece, K., Gonzales, D., Clark, S., Becker, J. M., Yeo, G. S. H., Fioramonti, X., Merkle, F. T., ... Cota, D. (2021). Functional heterogeneity of POMC neurons relies on mTORC1 signaling. *Cell Reports*, *37*(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109800>
- Schaeffer, M., Hodson, D. J., & Mollard, P. (2014). The Blood-Brain Barrier as a Regulator of the Gut-Brain Axis. En P. J. D. Delhanty & A. J. van der Lely (Eds.), *Frontiers of Hormone Research* (Vol. 42, pp. 29–49). S. KARGER AG. <https://doi.org/10.1159/000358313>
- Seong, J., Kang, J. Y., Sun, J. S., & Kim, K. W. (2019). Hypothalamic inflammation and obesity: A mechanistic review. *Archives of Pharmacal Research*, *42*(5), 383–392. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01138-9>
- Shibuya, S., Watanabe, K., Sakuraba, D., Abe, T., & Shimizu, T. (2022). Natural Compounds That Enhance Motor Function in a Mouse Model of Muscle Fatigue. *Biomedicines*, *10*(12), 3073. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123073>
- Stensel, D. (2011). Exercise, Appetite and Appetite-Regulating Hormones: Implications for Food Intake and Weight Control. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *57*(Suppl. 2), 36–42. <https://doi.org/10.1159/000322702>

- Thaler, J. P., Yi, C.-X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., Zhao, X., Sarruf, D. A., Izgur, V., Maravilla, K. R., Nguyen, H. T., Fischer, J. D., Matsen, M. E., Wisse, B. E., Morton, G. J., Horvath, T. L., Baskin, D. G., Tschöp, M. H., & Schwartz, M. W. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(1), 153–162. <https://doi.org/10.1172/JCI59660>
- Torres-Villarreal, D., Camacho, A., Castro, H., Ortiz-Lopez, R., & de la Garza, A. L. (2019). Anti-obesity effects of kaempferol by inhibiting adipogenesis and increasing lipolysis in 3T3-L1 cells. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *75*(1), 83–88. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0659-4>
- Vernia, S., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D. Y., Kim, J. K., & Davis, R. J. (2013). Diet-induced obesity mediated by the JNK/DIO2 signal transduction pathway. *Genes & Development*, *27*(21), 2345–2355. <https://doi.org/10.1101/gad.223800.113>
- Wang, T., Wu, Q., & Zhao, T. (2020). Preventive Effects of Kaempferol on High-Fat Diet-Induced Obesity Complications in C57BL/6 Mice. *BioMed Research International*, *2020*, 4532482. <https://doi.org/10.1155/2020/4532482>
- Wang, Z., Li, X.-L., Hong, K.-F., Zhao, T.-T., Dong, R.-X., Wang, W.-M., Li, Y.-T., Zhang, G.-L., Lin, J., Gui, D.-K., & Xu, Y.-H. (2021). Total flavonoids of Astragalus Ameliorated Bile Acid Metabolism Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, *2021*, 6675567. <https://doi.org/10.1155/2021/6675567>
- Watanabe, M., Houten, S. M., Matakai, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J. W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A. C.,

- & Auwerx, J. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, *439*(7075), 484–489. <https://doi.org/10.1038/nature04330>
- Waterson, M. J., & Horvath, T. L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism*, *22*(6), 962–970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>
- Westerterp, K. R. (2017). Control of energy expenditure in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, *71*(3), 340–344. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.237>
- Westerterp, K. R. (2018). Exercise, energy balance and body composition. *European Journal of Clinical Nutrition*, *72*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0180-4>
- WHO, W. H. O. (2021). *Obesidad y Sobrepeso*. <https://www.who.int/health-topics/obesity>
- Wilkinson, M., & Imran, S. A. (2018). *Clinical Neuroendocrinology: An Introduction* (1a ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108149938>
- Wilson, J. L., & Enriori, P. J. (2015). A talk between fat tissue, gut, pancreas and brain to control body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *418*, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.022>
- Wu, Z., Martinez, M. E., St. Germain, D. L., & Hernandez, A. (2016). Type 3 Deiodinase Role on Central Thyroid Hormone Action Affects the Leptin-Melanocortin System and Circadian Activity. *Endocrinology*, *158*(2), 419–430. <https://doi.org/10.1210/en.2016-1680>
- Yau, W. W., Singh, B. K., Lesmana, R., Zhou, J., Sinha, R. A., Wong, K. A., Wu, Y., Bay, B.-H., Sugii, S., Sun, L., & Yen, P. M. (2018). Thyroid hormone (T3) stimulates brown adipose tissue activation via mitochondrial biogenesis and MTOR-mediated

mitophagy. *Autophagy*, 15(1), 131–150.

<https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1511263>

Zang, Y., Zhang, L., Igarashi, K., & Yu, C. (2015). The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food & Function*, 6(3), 834–841. <https://doi.org/10.1039/C4FO00844H>