TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA

‘’Seguridad hepática y efecto anti-obesogénico del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído en ratas’’

Tesis que presenta Sergio Guzmán Rodríguez para optar por el grado de Maestría en ciencias en el área de toxicología

Tutores:

Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino

Dr. Jesús Chávez Reyes

Asesor:

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Aguascalientes, Ags., México 2020

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

CARTA DE VOTO APROBATORIO INDIVIDUAL

JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como ***TUTOR*** designado del estudiante ***SERGIO GUZMÁN RODRÍGUEZ*** con ID *153648* quien realizó la tesis titulado: ***"SEGURIDAD HEPÁTICA Y EFECTO ANTI-OBESOGÉNICO DEL 1-BOC-PIPERIDINA-4-CARBOXALDEHÍDO EN RATAS"***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a día *13* de octubre de 2020.

Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino
Tuto de tesis
El nombre completo que aparece en el Voto Aprobatorio debe coincidir con el que aparece en el documento empastado. No se puede abreviar, ni omitir nombres

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como ***CO-TUTOR*** designado del estudiante ***SERGIO GUZMÁN RODRÍGUEZ*** con ID *153648* quien realizó la tesis titulado: ***''SEGURIDAD HEPÁTICA Y EFECTO ANTI-OBESOGÉNICO DEL 1-BOC-PIPERIDINA-4-CARBOXALDEHÍDO EN RATAS"***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a día 20 de Octubre del 2020.

Dr. Jesús Chávez Reyes
***Co*-Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
_____
P R E S E N T E

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante ***SERGIO GUZMÁN RODRÍGUEZ*** con ID *153648* quien realizó la tesis titulado: ***"SEGURIDAD HEPÁTICA Y EFECTO ANTI-OBESOGÉNICO DEL 1-BOC-PIPERIDINA-4-CARBOXALDEHÍDO EN RATAS"***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a día 23 de noviembre del 2020.

Dr Andrés Quintanar Stephano
Asesor de Tesis

El

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

POSGRADOS UAA

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 26/11/2020

NOMBRE: Sergio Guzmán Rodríguez **ID** 153648

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS ÁREA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA **LGAC (del posgrado):** TOXICOLOGÍA

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis ( ) Trabajo Práctico

TITULO: **"Seguridad hepática y efecto anti-obesogénico del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído en ratas"**

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): El trabajo se diseño para encontrar nuevas alternativas terapéuticas y/o profilácticas potenciales para el combate farmacológico contra la obesidad mediante el uso de las piperidinas, lo cual tiene un innegable impacto social en nuestro entorno.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

	Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnologíca o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferecia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
	El egresado cumple con lo siguiente:
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias,estancia, predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutorpodrá liberar solo el tutor
N.A.	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
	En caso de Tesis por artículos científicos publicados
	Aceptación o Publicación de los articulos según el nivel del programa
	El estudiante es el primer autor
	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí X

No ____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION: Dra. Elsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

*** En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutoral, asignado por el Decano**

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dra. Haydée Martínez Ruvalcaba

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: .... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico: ... del seguimiento de los alumnos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Agradecimientos

Este proyecto de tesis pudo ser llevado a cabo gracias al apoyo formativo, académico y estructural de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA). Así mismo, gracias al grado de reconocimiento PNPC con el cual cuenta la maestría de Biotecnología Vegetal o Toxicología, se le extiende un gran agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) el cual proporcionó los subsidios económicos pertinentes para el desarrollo de esta investigación científica.

Por otra parte, se le brinda un gran reconocimiento a mi comité tutoral, ya que fueron los responsables directos de mi formación académica, profesional y en la investigación durante el periodo del posgrado; especialmente a los doctores Bruno Antonio Marichal Cancino y Jesús Chaves Reyes los cuales considero fueron una pieza clave en mi desarrollo como investigador. Aunado a esto, me encuentro muy agradecido con mi madre y mi esposa, por el fuerte apoyo incondicional económico y moral que todo el tiempo me han otorgado. En especial, por siempre haber confiado en mí y en mi superación académica y profesional. Gracias a todos por su confianza.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Índice

Índice ... 1
Índice de tablas ... 3
Índice de figuras. ... 3
Resumen ... 4
Abstract ... 6
1. Introducción ... 8
1.1 Mecanismos de control de la ingestión de alimentos ... 8
1.2 Fisiopatología de la obesidad ... 11
1.3 Modelos animales para el estudio de la obesidad: el atracón de alimentos y dieta de cafetería ... 13
1.4 El síndrome metabólico y el daño hepático inducidos por obesidad ... 15
1.5 Opciones terapéuticas y experimentales actuales para el tratamiento de la obesidad ... 20
1.6 Las piperidinas y el 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído ... 26
1.7 Fisiología y Farmacología del GPR119 ... 28
2. Antecedentes ... 34
3. Justificación ... 36
4. Hipótesis ... 37
5. Objetivos ... 37
5.1 Objetivo general ... 37
5.2 Objetivos particulares ... 37
6. Materiales y Métodos ... 38
6.1 Animales ... 38
6.2 Compuestos y alimentos utilizados ... 38
6.3 Métodos generales ... 39
6.4 Análisis estadístico ... 39
6.5 Bloque I ... 40
6.5.1 Prueba de atracón de alimentos ... 40
6.5.2 Prueba de ansiedad, laberinto en cruz elevado ... 42
6.5.3 Estudio *in silico* ... 43

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6.5.4 Análisis bioquímico 45
6.6 Bloque II 45
6.6.1 Modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería 45
6.6.2 Criterios de selección para la susceptibilidad a la obesidad 46
6.6.3 Tratamiento farmacológico 46
6.6.4 Análisis bioquímico 47
7. Resultados 48
7.1 Bloque I 48
7.1.1 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre la ganancia de peso de las ratas expuestas al modelo de atracón de alimentos 48
7.1.2 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre el comportamiento de atracón y en la preferencia del alimento hipercalórico en ratas 49
7.1.3 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre la conducta de ansiedad en ratas 51
7.1.4 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre la funcionalidad hepática 53
7.2 Bloque II 55
7.2.1 Clasificación en ratas susceptibles y resistentes a la dieta de cafetería 55
7.2.2 Efecto del 1-Boc-piperidina y la palmitoiletanolamida (PEA) sobre el peso corporal en ratas susceptibles a la obesidad expuestas a dieta de cafetería 55
7.2.3 Efecto del 1-Boc-piperidina y la PEA sobre la preferencia de alimentos en la rata 57
7.2.4 Efecto del 1-Boc-piperidina y la PEA sobre algunos parámetros bioquímicos en la sangre de ratas obesas 58
7.3. Evaluación de los posibles mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina mediante la técnica de docking y modelado molecular 60
8. Discusiones 65
8.1 Discusión general 65
8.2 Posibles efectos profilácticos y seguridad hepática del 1-Boc-piperidina 66
8.3 Posibles efectos terapéuticos del 1-Boc-piperidina contra la obesidad 69
8.4 Caracterización preliminar de los mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina 71
8.5 “Consideraciones finales y perspectivas” 72
9. Conclusión 73

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

10. Glosario 73
11. Perspectivas 76
12. Referencias 77

Índice de tablas

TABLA NO. 1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS PARA EL SÍNDROME METABÓLICO. 17
TABLA NO. 2. RANGO DE PERÍMETRO ABDOMINAL POR REGIÓN. 17
TABLA NO. 3. CRITERIOS DE IMC PARA TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO. 23
TABLA NO. 4. FÁRMACOS CONTRA LA OBESIDAD..... 22
TABLA NO. 5. CRITERIOS DE DERIVACIÓN PARA CIRUGÍA BARIÁTRICA..... 23
TABLA NO. 6. VALORES DE PKI PARA LIGANDOS DE GPCRS EN RATAS. 62

Índice de figuras.

FIGURA NO. 1. ETAPAS DEL NAFLD. 18
FIGURA NO. 2. ESTEATOSIS HEPÁTICA. 19
FIGURA NO. 3. ACTIVACIÓN DE GPR119 POR LOS LÍPIDOS DE LA DIETA..... 30
FIGURA NO. 4. POSIBLE ACCIÓN DE LIGANDOS DE GPR119. 31
FIGURA NO. 5. PROTOCOLO DE ATRACÓN. 41
FIGURA NO. 6. PRUEBA DE ANSIEDAD. 43
FIGURA NO. 7. PROTOCOLO DE DIETA DE CAFETERÍA. 47
FIGURA NO. 8. EFECTO DE 1-BOC-PIPERIDINA EN EL INCREMENTO DE PESO EN LAS RATAS. 49
FIGURA NO. 9. EFECTO DEL 1-BOC-PIPERIDINA EN EL COMPORTAMIENTO DE ATRACÓN. 51
FIGURA NO. 10. LABERINTO EN CRUZ ELEVADO. 53
FIGURA NO. 11. PRUEBAS DE FUNCIONAMIENTO HEPÁTICO EN ANIMALES CON DIETA TIPO ATRACÓN Y TRATADOS CON VEHÍCULO Y 1 Y 10 µMOL/KG DE 1-BOC-PIPERIDINA. ... 54
FIGURA NO. 12. INCREMENTO DE PESO EN PROTOCOLO DE DIETA DE CAFETERÍA. 56
FIGURA NO. 13. CONSUMO CALÓRICO EN EL PROTOCOLO DE DIETA DE CAFETERÍA. 58
FIGURA NO. 14. ANÁLISIS DE BIOQUÍMICOS EN EL PROTOCOLO DE DIETA DE CAFETERÍA. 60
FIGURA NO. 15. MODELADO 3D DEL GPR119. 64
FIGURA NO. 16. POSES DE ACOPLAMIENTO EN TRES LIGANDOS DE GPR119. 64

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Resumen

Debido al creciente padecimiento de obesidad en México y a sus comorbilidades relacionadas (*e.g.*, la diabetes mellitus tipo 2; DMT2, dislipidemias, síndrome metabólico, entre otras), esta patología se ha convertido en blanco de estudio para crear estrategias novedosas que permitan combatir sus efectos deletéreos contra la salud. Este trabajo se diseñó con la intención de encontrar nuevas alternativas terapéuticas y/o profilácticas potenciales para el combate farmacológico contra la obesidad mediante el uso de las piperidinas. Las piperidinas son aminas biogénicas históricamente estudiadas en la Toxicología porque inicialmente se encontraron como alcaloides de la pimienta y en venenos de insectos. Sin embargo, las piperidinas también se producen en el cuerpo humano y sus acciones parecen estar relacionadas con la vigilia/sueño, el metabolismo y otros fenómenos cognitivos. Sorprendentemente, las piperidinas han sido un blanco de estudio ignorado en torno a sus potenciales aplicaciones terapéuticas. En este contexto, el 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído (1-Boc-piperidina) es una molécula derivada de piperidina sin mecanismo de acción reportado, aunque sus usos incluyen la síntesis de agonistas selectivos del receptor acoplado a proteínas G 119 (GPR119) que han sido patentados como posibles fármacos con efectos anti-obesogénicos y anti-diabetogénicos. El GPR119 es un receptor huérfano que ha sido propuesto como receptor putativo a cannabinoides. Algunos reportes previos sugieren que la estimulación del GPR119 podría producir un efecto anorexígeno (*i.e.*, disminución de la ingestión de alimentos). Además, se ha propuesto que este receptor produce un efecto protector de las células β pancreáticas mediado por un aumento en la producción y liberación de insulina mediante la activación de hormonas intestinales tales como el GLP-1, GIP, PYY. Este trabajo de tesis tuvo como eje central la evaluación preclínica de la utilidad profiláctica y terapéutica potencial del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído (1-Boc-piperidina) contra las conductas obesogénicas y la obesidad en ratas.

Se analizaron los efectos profilácticos del 1-Boc-piperidina en el modelo de atracón de alimentos hipercalóricos y sus efectos terapéuticos en animales susceptibles a la obesidad inducida por dieta de cafetería. En ambos casos, se analizó el efecto de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

los modelos experimentales y de los tratamientos empleados. Se evaluó la seguridad hepática del 1-Boc-piperidina usando como indicadores los niveles de las enzimas hepáticas, aspartato y alanina aminotransferasas. Se realizó una caracterización preliminar de los posibles mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina, mediante la evaluación por modelado molecular e interacción enzima-ligando (*docking*) de su capacidad para interactuar con los receptores GPR119, 5-HT6 y 5-HT7 (ya que dicha molécula se utiliza como sustrato en la síntesis de agonistas y antagonistas selectivos para estos receptores). Finalmente, ya que la ansiedad juega un papel fundamental en la aparición de la conducta de atracón de alimentos, evaluamos los efectos del 1-Boc-piperidina sobre la ansiedad en la prueba de laberinto en cruz elevado. Nuestros resultados sugieren que 1-Boc-piperidina: (i) inhibe el atracón de alimentos; (ii) retrasa el aumento de peso en sujetos obesos altamente susceptibles a la obesidad; (iii) su uso crónico parece ser seguro para las funciones hepáticas principales; y (iv) produce efectos ansiolíticos. Aunque no se pudo establecer un mecanismo de acción para los efectos antes mencionados, nuestros estudios *in silico* sugieren la posible participación del GPR119 y desestiman la participación de los receptores serotoninérgicos 5-HT6 y 5-HT7.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Abstract

Due to the growing obesity and its related comorbidities in Mexico (*e.g*., type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemias, metabolic syndrome, among others), this pathology has raised research lines focus in the development of novel strategies to prevent its deleterious effects on health. This study was designed to find new potential therapeutic and/or prophylactic alternatives for the pharmacological treatment of obesity by using piperidines. Piperidines are biogenic amines historically studied in Toxicology because they were initially found as alkaloids of peppers and in insect poisons. However, piperidines are also produced in the human body and their actions are related to wakefulness/sleep, metabolism, and other cognitive phenomena. Surprisingly, piperidines have been an overlooked target of study regarding their potential therapeutic applications. In this context, 1-Boc-piperidine-4-carboxaldehyde (1-Boc-piperidine) is a piperidine-derived molecule with no reported mechanism of action, although its uses include the synthesis of selective agonists of the G 119 protein-coupled receptor (GPR119) that have been patented as possible drugs with anti-obesogenic and anti-diabetogenic effects. GPR119 is an orphan receptor that has been proposed as a putative cannabinoid receptor. Some previous reports suggest that GPR119 stimulation could produce an anorectic effect (*i.e*., decreased food intake). In addition, this receptor may produce a protective effect of pancreatic β cells has been proposed mediated by an increase in insulin release through the activation of intestinal hormones such as GLP-1, GIP, PYY. This thesis study exerted a preclinical evaluation of the potential prophylactic and therapeutic utility of 1-Boc-piperidine-4-carboxaldehyde (1-Boc-piperidine) against obesogenic behaviors and obesity in rats.

We analyzed the prophylactic effects of 1-Boc-piperidine in the binge-food model and its therapeutic effects in animals with obesity induced by a cafeteria diet. In both cases, the effect of the models and the treatments used was evaluated. The hepatic safety of 1-Boc-piperidine was estimated using the levels of liver enzymes, aspartate, and alanine aminotransferases as indicators. A preliminary characterization of the possible mechanisms of action of 1-Boc-piperidine was carried out, through the evaluation by molecular modeling and enzyme-ligand

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

interaction (docking) of its ability to interact with the GPR119, 5-HT6 and 5-HT7 receptors (since this molecule is used as a substrate in the synthesis of selective agonists and antagonists for these receptors). Finally, since anxiety plays a fundamental role in the appearance of binge eating behavior, we evaluated the effects of 1-Boc-piperidine on anxiety in the elevated plus maze test. Our results suggest that 1-Boc-piperidine: (i) inhibits binge eating; (ii) delays weight gain in obese subjects highly susceptible to obesity; (iii) its chronic use appears to be safe for the main liver functions; and (iv) produces anxiolytic effects. Although a mechanism of action could not be established for the effects, our i*n-silico* studies suggest the possible participation of GPR119 and disregard the participation of the serotonergic 5-HT6 and 5-HT7 receptors.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. Introducción

1.1 Mecanismos de control de la ingestión de alimentos

Los mecanismos que controlan la ingestión de alimentos son muy complejos y dependen de una serie de factores mecánicos, bioquímicos y conductuales como: la masticación, la deglución, la digestión, la excreción, el hambre, la saciedad, la actividad física, el ayuno prolongado, las funciones endocrinas, la producción de insulina por las células beta pancreáticas, entre otras (Munoz Tedo, R. Carlson, & Munoz Tedo, 2005). La homeostasis, un mecanismo de regulación interna del organismo, se compone de una serie de procesos fisiológicos, entre ellos la digestión, absorción de nutrientes en los intestinos, gasto calórico, así como de la excreción de residuos, entre otros; estas son funciones dependientes en gran medida del sistema nervioso autónomo parasimpático (Hall & Guo, 2017; Munoz Tedo et al., 2005). En este sentido, el organismo busca conseguir un balance energético interno, definido por la relación de las calorías ingeridas con el consumo o gasto energético requerido; si la ingesta supera el consumo calórico, el exceso de energía se almacena en el organismo en forma de grasas (Hall & Guo, 2017; Munoz Tedo et al., 2005). Si el exceso en el consumo calórico se mantiene a lo largo de los años, el aumento de peso irá ocasionando sobrepeso u obesidad y eventualmente síndrome metabólico, es decir, la interacción o coexistencia simultanea de factores que dan como resultado la obesidad, trastorno comúnmente acompañado por enfermedades como arterioesclerosis, hipertensión, dislipidemia en un mismo individuo (Furukawa et al., 2004). En marcado contraste, si la ingestión de nutrientes y calorías fuera la apropiada (es decir, la cantidad necesaria y variedad de los diferentes grupos de alimentos), lo que se debería esperar es un correcto desarrollo con un peso y talla apropiados durante el transcurso de la vida, promoviendo a un estado de salud nutricional óptimo (Servin, 2013).

La regulación del consumo energético en el humano es un proceso complejo que involucra aspectos homeostáticos, hedónicos, culturales y adaptativos (Hernández Ruiz de Eguilaz et al., 2018). En un esfuerzo por entender este proceso

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

complejo, se puede tratar de entender dividiendo la conducta en una función dual. Dicha función estaría constituida por dos impulsos opuestos: el apetito y la saciedad. Ambas conductas están controladas por núcleos hipotalámicos como: el núcleo lateral (LHA *por sus siglas en inglés*) el cual se puede considerar como la principal área donde se promueve la sensación del apetito; el núcleo ventromedial (VMH *por sus siglas en inglés*) área principal que controla la sensación de saciedad durante el proceso de ingestión de alimentos; así como diversas señales energéticas, endocrinas, gastrointestinales, sensoriales y de condicionamiento (Halpern et al., 2008; Ramírez-Orozco et al., 2019; Simpson, Martin, & Bloom, 2008). De igual modo, estos mecanismos son regulados por señales de tipo aferente o eferente (ej. señales producidas por leptina, grelina entre otras). Dichas señales están bajo el control del sistema nervioso periférico (SNP), que a su vez, estimulan la secreción de las hormonas α-estimulante de los melanocitos (MSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH), que actuando sobre el sistema nervioso central (SNC) inducen una respuesta de tipo anorexígena (señales que causan sensación de saciedad) u orexigénica (signos asociados a la sensación de apetito), donde los mecanismos de regulación de la ingesta ocurren en tiempos de corto, medio y a largo plazo (Gadde, Martin, Berthoud, & Heymsfield, 2018; González-Jiménez & Schmidt Río-Valle, 2012).

La primera señal que produce la sensación de apetito es la falta de glucosa en sangre. Los niveles de dicha molécula son censados por el hipotálamo. La glucosa es la fuente de energía más importante para el cerebro (Gadde et al., 2018).

En las ***señales de tipo aferente*** reguladas por el SNP se producen en diversos tejidos u órganos. Las señales pueden ser de tipo crónicas y agudas, las señales de tipo crónicas son producidas por los adipocitos (células encargadas de almacenar la energía en forma de triglicéridos) y son la leptina (que induce la reducción de la ingesta calórica o saciedad) y adiponectina (regula el catabolismo de lípidos y aumenta el metabolismo de la glucemia ya que se eleva la sensibilidad insulínica) (González-Jiménez & Schmidt Río-Valle, 2012; Palomer, Pérez, & Blanco-Vaca, 2005). La forma libre de la leptina se une al receptor ObRb (o alguna de sus isoformas) localizado en el hipotálamo, este receptor se encuentra

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

relacionado con el sistema JAK-STAT (una familia de tirosincinasas intracelulares) que desencadena una cascada de fosforilación, la cual finaliza con cambios en la regulación transcripcional y/o en los fosfolípidos de la membrana citoplasmática. La disminución en la concentración de leptina conduce a un aumento del apetito y a un gasto energético reducido (Valle et al., 2005). En las señales agudas controladas por el SNP, se ha descrito a la insulina (producida y secretada en los islotes de Langerhans pancreáticos), la grelina (procedente del cuerpo del estómago) y el péptido YY (sintetizado en el tracto intestinal) (Dimaraki & Jaffe, 2006; Janas-Kozik, et al., 2006; Zhu, et al., 2013). La hormona insulina es sintetizada en el páncreas por las células beta, la secreción de ésta se encuentra regulada por la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo, su acción inicia cuando se une al receptor de la insulina (IR). La activación de ésta trae consigo una cascada de señalización que finaliza con la movilización del transportador GLUT4 a la pared celular, facilitando la entrada de la glucosa a las células, incluidas las hepáticas y musculares donde se almacena en forma de glucógeno, los niveles altos de insulina por tanto provocan la sensación de saciedad (Munoz Tedo et al., 2005; Tomlinson & Newnham, 1984). Por su parte, la secreción de la grelina es un iniciador de la ingestión de alimentos, este agonista endógeno se une al receptor secretagogo de la hormona del crecimiento (GHS-R), estimula la liberación de la hormona de crecimiento (GH) y se encuentra ampliamente involucrada en la conducta alimenticia y la regulación del metabolismo produciendo un efecto orexigénico mediado por el neuropéptido Y (NPY) y el péptido Agouti (AgRP) (Dimaraki & Jaffe, 2006; Janas-Kozik, et al., 2006). Por otro lado, el péptido YY es liberado por las células intestinales desde el íleon y colon de forma postprandial provocando sensación de saciedad mediante la activación del receptor Y_2 inhibiendo al NPY/AgRP y causando la activación de la molécula proopiomelancortina (POMC) (Giménez Palop & Caixàs, 2009).

El núcleo arqueado del hipotálamo procesa señales periféricas y crea nuevas señales que son transmitidas por dos grupos de neuronas: a) POMC y CART (producto de transcripción regulado por cocaína y anfetamina), lo que resulta en una vía catabólica, b) neuronas NPY y AgRP, lo que resulta en una vía anabólica (Gadde et al., 2018).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Por otro lado, la regulación fisiológica de los estados de saciedad y apetito está controlada por el ***sistema eferente***, formado por neuronas del hipotálamo del núcleo arqueado, esta señalización efectora va desde el SNC a los músculos o glándulas a través del cerebro anterior y el mesencéfalo que controla el sistema nervioso autónomo (Simpson et al, 2008). Asimismo, se organiza mediante dos vías: anabólicas y catabólicas. En las vías catabólicas, las neuronas de POMC y CART estimulan el gasto calórico y disminución del peso corporal, mediante la síntesis de MSH y la estimulación de los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3,4) en neuronas secundarias, éstas generan TSH y CRH (hormona liberadora de corticotropina) que aumentan el metabolismo energético (Gadde et al., 2018; Ricote, 2016; Simpson et al., 2008). Las vías anabólicas están conformadas por los péptidos NPY y AgRP estimulan señales neuronales eferentes que promueven el apetito y el aumento progresivo de masa corporal mediante la excitación de los receptores Y1 y Y5 en líneas neurales secundarias. Posteriormente, la activación de estos péptidos produce la liberación de la hormona concentradora de melanina (MCH) y otras orexinas que estimulan el apetito (Gadde et al., 2018; Ricote, 2016; Simpson et al., 2008).

Todos estos trabajos indican la gran complejidad de los mecanismos que participan en la regulación y balance del consumo energético, por lo que cualquier estudio encaminado a controlar la obesidad ya sea de manera natural (dieta balanceada) o mediante la investigación de fármacos reguladores del apetito, son factores clave para el control de la obesidad y la gran comorbilidad de padecimientos que la acompañan.

1.2 Fisiopatología de la obesidad

La obesidad en México es una patología que ha ido aumentando en la última década, afectando a una gran parte de la población. Se estima que el 72% de su población adulta la padece, siendo el segundo país con mayor índice de obesidad, colocándolo sólo detrás de los Estados Unidos de Norte América (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, 2017). El método que más se utiliza para valorar el nivel de exceso de peso es el **Í**ndice de **M**asa **C**orporal (kg/m^2)(IMC).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

De acuerdo con la clasificación de la OMS, se considera normo peso cuando el IMC se ubica entre los rangos de 18.5 y 24.9, el sobrepeso va entre 25 y 29.9 y la obesidad o exceso de peso cuando se establece un IMC mayor a 30.

La obesidad es resultado del desequilibrio entre el gasto y el aporte energético. Esta energía proviene en primera instancia del consumo y digestión de los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas), siendo los carbohidratos el primer peldaño y principal fuente de obtención de la glucosa (Servin, 2013). A través de la glucólisis, la glucosa proporciona al organismo la cantidad de trifosfato de adenosina (ATP, *por sus siglas en inglés*) necesarias para un correcto funcionamiento celular. El ATP es sintetizado en las mitocondrias gracias al proceso metabólico conocido como fosforilación oxidativa (Servin, 2013).

Ante un excedente de carbohidratos en la alimentación y una reducida actividad física o sedentarismo, la glucosa que no se puede almacenar como glucógeno en el hígado, es transportada hacia los adipocitos y ahí se almacena en forma de triglicéridos (grasas). En exceso, dichos triglicéridos propician un incremento en el tamaño y proporción de células adiposas ocasionando sobrepeso u obesidad, que al ir progresando da lugar al desarrollo del síndrome metabólico. El síndrome metabólico es un padecimiento multifactorial que aumenta la posibilidad de producir problemas cardiacos, evento cerebrovascular, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), etc. (Servin, 2013; López-Jaramillo et al., 2019; Lahsen, 2014).

Factores genéticos, fisiológicos, neuroendocrino, ambientales y psicosociales se han identificado como los más importantes en la progresión de la obesidad; por otro lado éstos factores se pueden agrupar en tres principales grupos biopsicosociales: biológicos, sociales y psicológicos (OMS, 2019; Goyena & Fallis, 2019). Sin embargo, hablando en términos generales, los principales factores que producen el sobrepeso y sus comorbilidades son: altos niveles de sedentarismo (actividad física reducida), así como una alimentación desbalanceada e incorrecta (comida chatarra, alimentos poco nutricios, comidas abundantes y altas en grasas, etc.). La conducta nutricional inadecuada actualmente es producto de diferentes agentes en los que la sociedad se desenvuelve, entre los que destacan el estrés y la ansiedad (e.g., extenuantes jornadas laborales, cuestiones académicas, entre otras),

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

acompañados de episodios recurrentes de cambios en el patrón de la dieta, en los que las personas se alimentan de una manera compulsiva y desmedida.

1.3 Modelos animales para el estudio de la obesidad: el atracón de alimentos y dieta de cafetería

La elevada y desmedida ingesta de calorías, regularmente comidas abundantes en lípidos y carbohidratos en tiempos cortos y repetidos, es lo que caracteriza al llamado “atracón de alimentos”; en la vida cotidiana, son momentos en el día en el cual las personas comen de forma compulsiva y desmedida (Alboni et al., 2017). Estos episodios compulsivos de alimentación normalmente están acompañados de ansiedad causada por angustia o estrés en las personas, los cuales normalmente son controlados por una recompensa agradable como los alimentos hipercalóricos (Doucette, Khokhar, & Green, 2015). En la rata, el modelo de atracón de alimentos es similar al comportamiento y preferencia alimentaria mostrada por los humanos. Esta semejanza, nos permite evaluar los procesos conductuales en el comportamiento de atracón, así como los efectos del aumento preferencial al alimento hipercalórico sobre el peso corporal, y el posible daño metabólico causado por los niveles elevados de glucosa sobre los niveles de insulina, triglicéridos colesterol y tejido adiposo (Brutman, Sirohi, & Davis, 2019; Turton, Chami, & Treasure, 2017). En investigaciones previas, se ha observado que estos modelos experimentales en ratas, inducen cambios neurobiológicos análogos al humano, semejantes a los trastornos que ocurren con el uso de sustancias de abuso (Turton et al., 2017).

Por otro lado, investigaciones en humanos han mostrado que las mujeres tienen una mayor probabilidad de desarrollar algún tipo de trastorno como la bulimia, anorexia, atracón o depresión que los hombres, esto debido a cuestiones hormonales, hedónicas y sociales las cuales influyen directamente en la dieta y la salud de los individuos (Brutman et al., 2019). Así mismo, se ha observado que debido a procesos hormonales y al dimorfismo sexual, las ratas hembra obtienen una mayor ganancia de peso corporal que los machos, lo que las vuelve blanco

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

perfecto para la inducción del aumento de peso mediante el modelo de atracón (Bernardis, Davis, & McEwen, 1986; Brutman et al., 2019). También se ha reportado que, entre mujeres universitarias con peso normal, la mayoría de las que padecían de episodios compulsivos sufrían de algún otro trastorno alimenticio como bulimia y ortorexia, además de padecer de momentos hedónicos negativos como angustia, tristeza y remordimiento. Lo anterior sugiere que al contrarrestar estos efectos hedónicos y fisiológicos negativos, se podrían prevenir e incluso revertir los estragos de la obesidad y sus comorbilidades (Brutman et al., 2019; Kells & Kelly-Weeder, 2019).

Lamentablemente, la vida productiva se ha vuelto cada vez más estresante, y se ha observado una estrecha relación entre una elevación del grado de estrés de los individuos con un incremento del sobrepeso y obesidad, así como del aumento de los eventos compulsivos (Figee et al., 2016; Terrazas-Romero, Flores-Boyso, Zenil-Magaña, Landa-Ramírez, & Reséndiz-Barragán, 2018).

En estas condiciones no es de extrañarse que se encuentren involucradas las respuestas neuronales, específicamente las provenientes del hipotálamo que media el estrés y el comportamiento alimentario. Otros autores han descrito cómo el estrés y las lesiones hipotalámicas en núcleos específicos promueven un aumento de la ingesta hipercalórica, mediado específicamente por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), también llamado el eje del estrés (Adam & Epel, 2007). En este sentido, las múltiples interacciones de retroalimentación entre el hipotálamo, la hipófisis y glándula adrenal se encuentran directamente relacionadas con la homeóstasis energética, además de otros procesos como la respuesta al estrés, conductuales y sexuales, entre otros. Estos procesos se encuentran mediados por la hormona adrenocortical llamada cortisol (en el humano, corticosterona en la rata) que favorece, de manera indirecta, la secreción de hormonas como insulina, leptina y NPY favoreciendo el desarrollo de trastornos alimenticios, emocionales y conductuales (Adam & Epel, 2007).

Otro modelo de gran utilidad para estudiar hábitos alimenticios inadecuados es la “dieta de cafetería”; un modelo utilizado para inducir sobrepeso en ratas, con la finalidad de extrapolar la conducta humana en cuanto a la elección de alimentos y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aumento de peso corporal. Los efectos ocasionados por la dieta de cafetería en función del tiempo incluyen: aumento de peso, dislipidemias, hipertensión arterial, enfermedades cardiacas, síndrome metabólico, diabetes mellitus tipo 2(DM2), entre otras. Todas ellas son de importancia médica y son el resultado de los malos hábitos alimenticios y la ingestión descontrolada de productos hipercalóricos y poco saludables (Sagae, et al., 2013; Sagae, et al., 2015). El consumo de alimento de cafetería que regularmente consta de papas “tipo Sabritas”; alimentos ricos en sacarosa y grasas como chocolate, galletas, pastelillos, bocadillos; así como alimentos tipo embutidos, que en conjunto estimulan la secreción de varias hormonas, entre las que se encuentran las incretinas (las cuales son activadas por lípidos), las células β pancreáticas e incluso a nivel hipotálamo, y que participan en el circuito de recompensa formado por la amígdala, núcleo accumbens (NAc) y área tegmental ventral (VTA), entre otras (Ramírez-Orozco et al., 2019; Sagae, et al., 2015; Zhu, et al., 2013), lo que eventualmente aumenta la ingestión o el gusto por este tipo de “alimentos chatarra”, lo que conduce a trastornos alimenticios, sobrepeso, obesidad, dislipidemia, hiperglucemia y en general las comorbilidades ya mencionadas de la obesidad (Sagae, et al., 2013; Sagae, et al., 2015).

Los daños metabólicos inducidos por los malos hábitos alimenticios en humanos se pueden estudiar usando estos dos modelos experimentales. Por lo que ambos fueron elegidos para desarrollar este trabajo de tesis.

1.4 El síndrome metabólico y el daño hepático inducidos por obesidad

El síndrome metabólico (SM), anteriormente nombrado como síndrome de resistencia a la insulina (RI), síndrome X o síndrome de Reaven (Carrasco, et al., 2013; Pineda, 2008), es un padecimiento relacionado principalmente con un trastorno en la asimilación y aprovechamiento de los carbohidratos y de los ácidos grasos, convirtiéndose en un creciente problema de salud debido a la directa asociación entre éste y la obesidad. De hecho, su alta incidencia se relaciona con la epidemia de sobrepeso y obesidad que impacta a casi un tercio de la población

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mundial. El síndrome metabólico y las enfermedades que conlleva (DM2, enfermedades cardíacas y en ocasiones cáncer) se han convertido en las principales causas de muerte y en un problema de salud de preocupación mundial (Mathiew-Quirós, Salinas-Martínez, Hernández-Herrera, & Gallardo-Vela, 2014; Pineda, 2008). Sin embargo, este síndrome poseía cierta dificultad para su diagnóstico debido a la serie tan diversa de criterios considerados para su diagnóstico.

El SM es un estado clínico multifactorial, es decir, se encuentra conformado de una sucesión de elementos derivados del exceso de grasa en el área abdominal y la insulinorresistencia, lo que aumenta el riesgo de adquirir patologías como DM2 y enfermedad cardiovascular (ECV) (Lahsen, 2014).

Este síndrome se encuentra caracterizado por niveles elevados de triglicéridos (hipertrigliceridemia), niveles de colesterol con una densidad elevada (HDL, *por sus siglas en inglés*) bajos, y lipoproteínas con una densidad baja (LDL, *por sus siglas en inglés*) altos, aumento de la glucosa en sangre (hiperglicemia), presión arterial elevada y circunferencia de cintura (Tabla 1. Obesidad abdominal según región del mundo), así como del descenso de la sensibilidad a la insulina (Pineda, 2008). En este sentido, se considera que una persona tiene síndrome metabólico al contar con al menos tres de estos criterios (Pineda, 2008).

Desde 1998, varias organizaciones han postulado diferentes conceptos y perspectivas para diagnosticar al síndrome metabólico, entre ellos el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR) de la OMS, el Grupo de Tratamiento de Adultos III (ATPIII), la Organización Estadounidense de Endocrinólogos Clínicos (AACE), la Fundación Internacional de Diabetes (IDF) y la Organización Estadounidense del Corazón (AHA / NHLBI) como se observa en la (Tabla 2) (Carrasco, et al., 2013; Pineda, 2008).

Tabla 1. En la tabla 1 se observan las cifras del rango de perímetro abdominal (en cm) por región, considerado como factor de riesgo de SM. Se considera obesidad abdominal el exceder los parámetros indicados en hombres y mujeres. Tomado de (Pineda, 2008).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Cifras de perímetro abdominal

Grupo étnico/región	Género	Perímetro abdominal (cm)
Europeos	Hombres	≥94
	Mujeres	≥80
EUA	Hombres	≥102
	Mujeres	≥88
Asia sudeste/chinos	Hombres	≥90
	Mujeres	≥80
Latinoamericanos (incluida Colombia) *	Hombres	≥90
	Mujeres	≥80

* No hay estudios pero se recomienda usar los límites de la población asiática. También estos valores fueron aceptados en el Consenso de SM de la Asociación Colombiana de Endocrinología[17].

Tabla 2. La tabla sobre los criterios diagnósticos de síndrome metabólico muestra los diversos elementos de riesgo que han sido postulados para el diagnóstico del síndrome metabólico según distintas organizaciones, tales como OMS, EGIR, ATPIII, AACE, IDF, AHA/NHLBI, considerándose un síndrome metabólico al padecer tres o más de estos criterios Tomado de (Pineda, 2008).

Cuadro. 2. Criterios diagnósticos para síndrome metabólico.

Criterio	OMS (1998)	EGIR (1999)	ATP III (2001)	AACE (2003)	IDF (2005)	AHA/NHLBI (2005)
RI	AGA, IC, DM2 o sensibilidad disminuida a la insulina[1]	Insulina plasmática >perc. 75 Dos o más de los siguientes	Ninguno Tres o más de los siguientes	AGA o IC Más cualquiera de los siguientes según juicio clínico	Ninguno	Ninguno Tres o más de los siguientes
Obesidad	Dos más de los siguientes H: RCC[2] >0.9M: RCC >0.85y/o IMC >30	H: PA[3] ≥94 cm M: PA ≥80 cm	H: PA ≥102 cm M: PA ≥88 cm	IMC≥25	PA elevado según la población (Cuadro 3) Más 2 de los siguientes	H: PA ≥102 cmM: PA ≥88 cm
Dislipidemia	TG ≥150 mg/dl y/o H: HDL <35 mg/dlM: HDL <39	TG ≥150 mg/dl y/o HDL <39	TG ≥150 mg/dlH: HDL <40 mg/dlM: HDL <50 mg/dl	TG ≥150 mg/dlH: HDL <40 mg/dlM: HDL <50 mg/dl	TG ≥150 mg/dl o con medicamentos para disminuir TGH: HDL <40 mg/dlM: HDL <50 mg/dlO con medicamentos para aumentar HDL	TG ≥150 mg/dl o con medicamentos para disminuir TGH: HDL <40 mg/dlM: HDL <50 mg/dl O con medicamentos para aumentar HDL
PA	≥140/90 mm Hg	≥140/90 mm Hg o con antihipertensivos	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130/85 mm Hg o en tratamiento antihipertensivo	≥130/85 mm Hg o en tratamiento antihipertensivo
Glicemia	AGA, IC o DM2	AGA o IC pero no DM	>110 mg/dl incluyendo DM	AGA o IC, pero no DM	≥100 mg/dl, incluyendo DM	≥100 mg/dl, o con medicamentos antidiabéticos
Otros	Microalbuminuria			Otras características de IR (Cuadro 2)		

1. Condiciones de hiperinsulinemia euglicémica con toma de glucosa en el cuartil inferior 2. RCC: Relación cintura/cadera 3. PA: Perímetro abdominal

Tomando en cuenta este conjunto de sucesos que envuelven al síndrome metabólico, se considera que la enfermedad de hígado graso no alcohólico o

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

esteatosis hepática (EHGNA) como la manifestación del síndrome metabólico, siendo ésta el padecimiento hepático crónico más predominante en países industrializados, oscilando entre el 10% y 23% (Buqué, 2008; Lee, et al., 2018). Un estudio en México reveló que 8 de cada 10 pacientes con SM en el Instituto Mexicano del Seguro Social contaban con algún estadio de NAFLD (Castro, et al., 2012). Este creciente suceso clínico comúnmente asintomático, se encuentra dado por su estrecha relación con el exceso de peso y SM, los cuales son precursores de un gran número de complicaciones, entre ellas la DM2 y enfermedades cardiovasculares (Buqué, 2008; Fan, et al., 2019). De tal manera que los principales detonantes de la esteatosis, que se distingue por un almacenamiento desmesurado de grasas en el hígado son: la insulinorresistencia y el exceso de ácidos grasos, los cuales son determinantes en la fisiopatología de la enfermedad (Buqué, 2008).

La enfermedad hepática puede ir desde una esteatosis o hígado graso simple, considerado como benigno, hasta desencadenar una serie de sucesos metabólicos que eventualmente pueden desencadenar en una cirrosis y posteriormente en una hepatocarcinoma, como se observa en la figura 1 (Buqué, 2008; Tomic, et al., 2018).

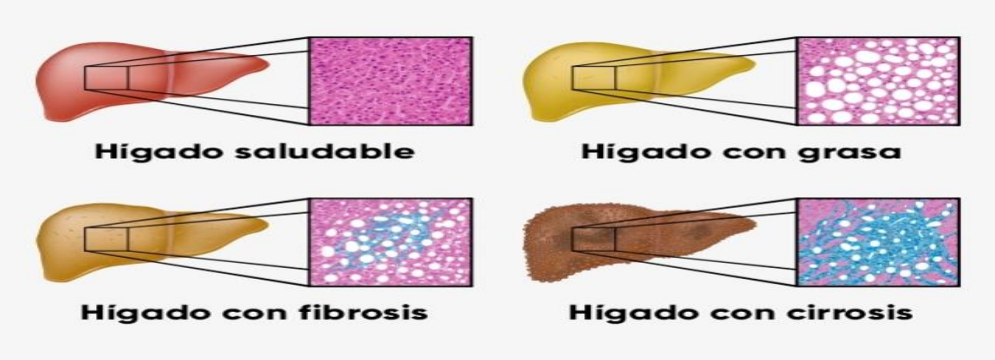


Figura 1. Etapas del hígado graso no alcohólico (NAFLD). La enfermedad hepática puede ir desde una esteatosis o hígado graso simple comúnmente benigno, o evolucionar a cambios metabólicos que eventualmente pueden finalizar en cirrosis hepática o en una hepatocarcinoma. Tomado de (Alarcón 2020).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La esteatosis se puede diferenciar en varias etapas correspondientes a la evolución de la enfermedad. La primera etapa es la ya mencionada esteatosis simple o NAFLD que se caracteriza por acumulación de ácidos grasos en forma de microvesículas en más del 5% del citoplasma del hepatocito, condición que comúnmente se considera benigna dado que suele ser reversible (figura 2A) (Tomic, et al., 2018).

La segunda es la llamada esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), caracterizada por la acumulación de lípidos en forma de macrovesículas que ocasiona el desplazamiento del núcleo celular hacia la periferia y la lesión de hepatocitos (figura 2B). Cuando la esteatosis persiste se liberan citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y algunas interleucinas como la (IL-1 e IL-6), lo que resulta en estrés oxidativo, toxicidad lipídica y eventualmente una disfunción mitocondrial (Lee, et al., 2018; Tomic, et al., 2018). Seguido de esto, se produce una fibrosis (figura 2C) que paulatinamente puede llegar a una cirrosis (o cicatrización tardía) en el tejido hepático, lo que provoca apoptosis o necrosis celular y posteriormente una hepatocarcinoma, siendo estos últimos estadios de naturaleza irreversible (Lee, et al., 2018; Tomic, et al., 2018).

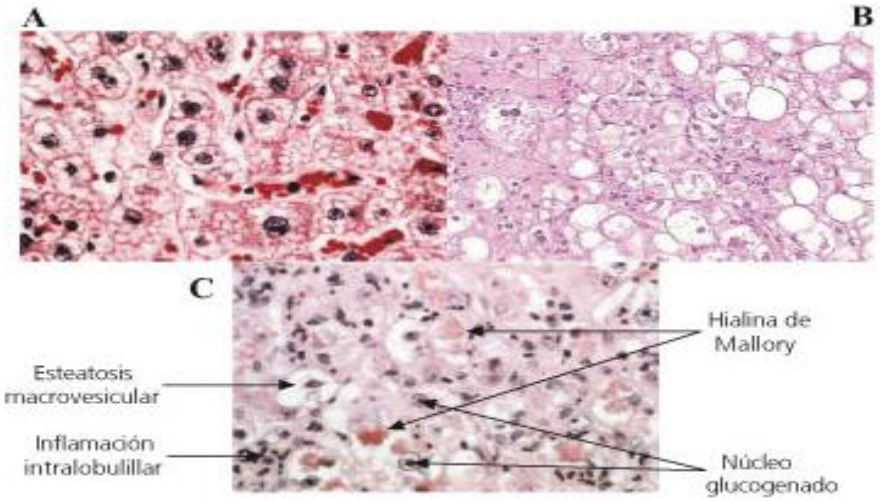


Figura 2. Imágenes histológicas de esteatosis hepática. Dónde A) y B) muestran lesiones micro vesiculares y macro vesiculares respectivamente y C) representando el daño por esteatohepatitis. Tomado de (Buqué, 2008).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Dada la estrecha asociación entre la incorrecta nutrición y el desarrollo de diversas enfermedades, es de suma importancia convencer a los pacientes de una correcta alimentación acompañada de actividad física regular, esto para prevenir el padecimiento de enfermedades como el síndrome metabólico e inclusive revertir el daño hepático.

1.5 Opciones terapéuticas y experimentales actuales para el tratamiento de la obesidad

Debido a todos los eventos crónico-degenerativos ocasionados por el exceso de peso y el sedentarismo, así como el aumento del consumo de alimentos chatarra y el estrés resultado de la vida cotidiana (laboral, escolar, etc.), el exceso de peso se presenta como uno de los principales desafíos para los sistemas de salud (Jayasinghe, Chiavaroli, Holland, Cutfield, & O'Sullivan, 2016; Lozano & González, 2010), siendo por ello blanco de diversas alternativas terapéuticas. Los tratamientos para la obesidad se deben manejar con una perspectiva a largo plazo y evitando futuras ganancias de peso, esto con el fin de lograr una adaptación al estilo de vida, necesidades físicas y condiciones patológicas individuales de cada paciente (Fujioka, 2002; Soto González & López-Villalta Lozano, 2010). Aunado a esto, el control óptimo de la obesidad se debe proponer como un tratamiento en conjunto mediante la implementación de todos los medios disponibles, para lograr una correcta disminución de peso y mantenimiento de este (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

En cuanto a las opciones terapéuticas actuales para contrarrestar la obesidad, se indica una alimentación balanceada y la actividad física acorde, ambas especificas e individualizadas según los hábitos y las necesidades patológicas de cada paciente. Aunado a esto, se recomienda el uso concomitante de estrategias conductuales (técnicas de autocontrol, psicoterapia en grupo para incrementar la autoestima, etc.) para complementar de manera exitosa el tratamiento (Fujioka, 2002; Soto González & López-Villalta Lozano, 2010; Lafuente, 2011). Seguido de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

estas tres opciones, se encuentra el tratamiento farmacológico y como última opción y solo en situaciones de obesidad grave, se recomienda la cirugía bariátrica. Algunos de los tratamientos farmacológicos utilizados aceptados por la Administración de drogas y alimentos (FDA *por sus siglas en inglés*) con su uso a corto y a largo plazo se muestran en la tabla 3 (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

Una dieta correcta o saludable debe ser individualizada, equilibrada, variada, inocua, suficiente y adecuada a la persona según su sexo, edad, etapa de desarrollo, actividades realizadas, así como de los padecimientos patológicos relacionados al paciente (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010). Las dietas recomendadas en general para el tratamiento de la obesidad incluyen aquellas que causen un equilibrio energético negativo, es decir que el consumo de calorías sea menor al gasto que se genera durante el día, por lo cual se utilizan dietas hipocalóricas para lograr el descenso de la masa corporal y llevar un buen mantenimiento a largo plazo (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010). Regularmente son dietas con bajo contenido energético y grasas, que oscilan de entre un 15% a 25% de lípidos sobre consumo calórico total, los hidratos de carbono van de 50% a 55% con un incremento en la ingesta de carbohidratos complejos y elevados en fibra, esto mediante la ingesta de cereales, granos, frutas y verduras; adicionalmente la ingesta de proteínas se recomienda de alto valor biológico, tales como pescado, pollo, carnes magras, leguminosas y cereales y su porcentaje de ingesta diaria va de entre el 15% al 25% del consumo total diario (Fujioka, 2002; Soto González & López-Villalta Lozano, 2010). Finalmente, se recomienda evitar la ingesta de comidas y bebidas azucaradas, así como de grasas saturadas (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

Para que el tratamiento a largo plazo sea favorable, se deben tomar en cuenta además de la alimentación y el ejercicio, estrategias para la implementación de la modificación del comportamiento (manejo del estrés, control de alimentos ingeridos, motivación para la actividad física, etc.), éstas estrategias son de vital importancia ya que en un largo periodo de tiempo, ayudan a la construcción de nuevos hábitos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

físicos y alimenticios, los que permitirán evitar la recaída o el llamado rebote (Fujioka, 2002; Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

El uso farmacológico para pacientes con problemas de obesidad se encuentra recomendado en individuos con un IMC ≥27, y que la disminución del peso haya fallado por los medios convencionales (dieta y ejercicio) como se observa en la tabla 4. Sin embargo, no se recomienda el uso aislado de fármacos para la pérdida de peso, sino el uso conjunto de las estrategias ya mencionadas, todo con el fin de un exitoso tratamiento (Fujioka, 2002; Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

Tabla 3. Fármacos utilizados para el tratamiento de la obesidad. En la tabla se muestran algunos de los medicamentos utilizados en contra la obesidad y sus mecanismos, así como de la aprobación por la FDA de su uso a corto y largo plazo. Tomado de (Fujioka, 2002).

Cuadro. 3. Fármacos contra la obesi

Fármaco	Mecanismo
Aprobado por la FDA para uso a corto plazo	
Clorhidrato de benzfetamina	Estimula la liberación de NE
Tartrato de fendimetrazina	Estimula la liberación de NE
Fentermina clorhidrato o tartrato	Estimula la liberación de NE
Clorhidrato de dietilpropión	Estimula la liberación de NE
Mazindol	Bloquea la recaptación de NE
Aprobado por la FDA para uso a largo plazo *	
Clorhidrato de sibutramina	Bloquea la recaptación de NE y 5-HT
Ortistat	Bloquea las lipasas gástricas y pancreáticas
Agentes de investigación †	
Bupropion	Mejora la actividad de NE
Topiramato ‡	Mejora GABA; bloquea los subtipos de receptores de glutamato

- * Estos agentes están aprobados por la FDA tanto para la disminución como para el mantenimiento del peso corporal.
- † Estos agentes están aprobados por la FDA para condiciones médicas distintas de la pérdida de peso.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- ‡ Se desconocen los mecanismos exactos de acción.
- FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos; NE, norepinefrina; 5-HT, serotonina; GABA, ácido gamma aminobutírico.

Tabla 4. Criterios de indicación de la farmacoterapia contra la obesidad. Se muestran los criterios que se deben tomar en cuenta para el tratamiento con fármacos anti-obesidad. Tomado de (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

-IMC > 30 Kg/m2
-IMC > 27 Kg/m2 con comorbilidades asociadas + 2 factores de riesgo*

Los procedimientos quirúrgicos han demostrado tener buenos resultados en cuanto a la pérdida del peso corporal, sin embargo no se encuentran exento de riesgos potenciales, por lo cual según un consenso por parte de los Institutos de Salud (NIH) de EUA, se consideran candidatos para el tratamiento quirúrgico los pacientes que cuentan con obesidad mórbida con un IMC ≥40 o en ocasiones pacientes con un IMC ≥35, pacientes con comorbilidades de alto riesgo o con afecciones físicas significativas (tabla 5) (Fujioka, 2002; Soto González & López-Villalta Lozano, 2010). Este tipo de tratamiento solo se recomienda en las situaciones ya mencionadas, así como de haberse agotado los métodos básicos utilizados.

Tabla 5. Requisitos para derivar pacientes obesos a cirugía bariátrica**:** Pacientes con obesidad mórbida o pacientes con comorbilidades de alto riesgo o con afecciones físicas significativas. Tomado de (Soto González & López-Villalta Lozano, 2010).

Derivación para cirugía bariátrica
- IMC > 40 Kg/m2
- IMC > 35 Kg/m2 + 2 factores de riesgo*
- CC >102 cm en varones y 90 cm en mujeres + 2 factores de riesgo*

*DM, HTA, Dislipemia, SAOS (Síndrome Apnea obstructiva del sueño)

En la actualidad el sistema endocannabinoide (SEC) se ha vuelto blanco de estudio experimental debido a sus diversas acciones fisiológicas, con efectos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nerviosos centrales y periféricos. Está implicado en fenómenos como la memoria, aprendizaje, emociones, inflamación, dolor, neuroprotección, comportamiento adictivo, homeostasis energética y conducta alimenticia (Joshi & Onaivi, 2019; Richey & Woolcott, 2017; Valenzuela Avendaño & Cruz, 2014).

Este sistema ha sido estudiado por ser el responsable de los efectos psicotrópicos causados por el tetrahidrocannabinol (THC) principal activo de la planta de marihuana (*Cannabis sativa*) (Bermudez-Silva, Viveros, McPartland, & Rodriguez de Fonseca, 2010; Joshi & Onaivi, 2019; Valenzuela Avendaño & Cruz, 2014). El THC es un agonista exógeno de los receptores a cannabinoides endógenos, la unión del THC con su receptor cannabinoide CB1 promueve diferentes efectos fisiológicos, entre ellos destacan la estimulación del apetito, lo cual lo convierte en un potencial blanco farmacológico para tratar la obesidad (Joshi & Onaivi, 2019; Valenzuela Avendaño & Cruz, 2014).

Existen dos principales receptores reconocidos a cannabinoides, el CB1 y CB2. Ambos son receptores metabotrópicos, es decir, son receptores acoplados a una proteína G (GPCRs) y forman parte de una extensa familia de proteínas que funcionan como transductores de señales a través de la membrana plasmática (Joshi & Onaivi, 2019; Richey & Woolcott, 2017; Valenzuela Avendaño & Cruz, 2014). Los receptores GPCR funcionan como sensores moleculares transmembrana de neurotransmisores, hormonas, nutrientes, metabolitos, etc. (Cvijanovic et al., 2017; Hansen, Rosenkilde, Holst, & Schwartz, 2012).

A diferencia del CB2, el receptor CB1 se encuentra con mayor abundancia en el cerebro y se expresa tanto a nivel central como periféricamente, actuando en intestinos, hígado, páncreas, musculo esquelético, tejido graso, etc. (Cruz, 2014; Richey & Woolcott, 2017). Por otro lado, el CB2 se ha identificado principalmente en células hematopoyéticas e inmunes, y en poca cantidad en el cerebro y algunas zonas periféricas como páncreas e hígado (Cruz, 2014).

El organismo produce sus propios ligandos endógenos nombrados endocannabinoides, éstos se encuentran biosintetizados a base de fosfolípidos de membrana, existiendo varios tipos, de los cuales destacan la anandamida o araquidonoiletanolamida (AEA) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Joshi & Onaivi,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2019; Richey & Woolcott, 2017). Ambos endocannabinoides son degradados por la enzima ácido graso amido hidrolasa (AGAH) y la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), respectivamente (Cruz, 2014).

Investigaciones previas han demostrado la participación del SEC en funciones de homeostasis energética del organismo (Bermudez-Silva et al., 2010; Cruz, 2014). La conducta alimenticia se puede ver regulada en general por dos tipos de control del apetito: homeostático y hedónico, los cuales se refieren a la regulación del requerimiento energético para el funcionamiento del organismo y las circunstancias socioculturales-emocionales que resultan en señalizaciones de placer y recompensa que giran en torno al consumo del alimento, respectivamente (Cruz, 2014; Richey & Woolcott, 2017).

De las regiones encefálicas relacionadas con el control de la homeostasis energética y el consumo de alimentos, el hipotálamo es el principal regulador de estos mecanismos (Joshi & Onaivi, 2019; Richey & Woolcott, 2017). El núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) cuenta con grupos de neuronas con funciones orexígenas y anorexígenas. Las neuronas orexígenas promueven la liberación de los péptidos involucrados con AgRP y NPY, con efectos orexígenos, mientras que las neuronas anorexígenas expresan a los péptidos POMC y CART, con efecto anorexígeno (Cruz, 2014; Richey & Woolcott, 2017).

Las señales de ambos grupos de neuronas se proyectan a distintas áreas cerebrales. Por un lado, a las neuronas CRH-érgicas consideradas de segundo orden y localizadas en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN), que a su vez mandan sus axones al núcleo del tracto solitario (NTS) el cual funciona como centro de control de la saciedad al iniciar una respuesta efectora sobre la ingesta de alimentos (Cruz, 2014; Richey & Woolcott, 2017). Por otro lado, las señales desde el hipotálamo lateral (HL) estimulan la liberación de péptidos (orexinas) que excitan al NPY y AgRP, y reprimen la actividad neural de POMC y CART del ARC, logrando un potente efecto estimulante del apetito (Cruz, 2014; Joshi & Onaivi, 2019). De tal manera que, si se activa el receptor CB1 localizado en las terminaciones presinápticas del núcleo arqueado, por los cannabinoides endógenos AEA y el 2-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AG, resulta en una disminución de POMC y CART y un aumento del apetito (Cruz, 2014).

Así, por lo antes expuesto, se sabe que los endocannabinoides cuentan con efectos orexígenos (Cruz, 2014). Se ha visto que el aumento de la ingesta de ácido graso linoléico en la dieta puede promover un aumento en la síntesis de endocannabinoides, es decir el incremento en el consumo de alimentos altos en grasas promueve a su vez, el aumento del apetito, lo que conforma un círculo vicioso de obesidad (Bermudez-Silva et al., 2010; Cruz, 2014).

Con respecto al control del apetito hedónico, éste se encuentra regulado principalmente por el sistema mesocorticolímbico, en el cual se encuentran implicadas neuronas dopaminérgicas. Estas neuronas se encuentran en el área tegmental ventral que proyecta sus axones al núcleo accumbens y al córtex prefrontal (CPF), por lo que al ingerir alguna comida apetitosa se libera más dopamina y aumenta la sensación de placer (Cruz, 2014).

Se ha reportado la participación del SEC en estos dos tipos de control y con ello ha aumentado el interés por estudiar los receptores cannabinoides por su posible potencial terapéutico para el control de la obesidad, principalmente de drogas inhibidoras de los receptores CB1(Cruz, 2014; Joshi & Onaivi, 2019).

En la actualidad se han localizado varios receptores huérfanos a cannabinoides como potenciales blancos terapéuticos para la obesidad, entre ellos el GPR119 y GPR55, siendo este último del que más conocimiento se tiene. Ambos cuentan con sus propios endocannabinoides, la oleiletanolamida (OEA) y la palmitoiletanolamida (PEA), respectivamente (Godlewski, Offertáler, Wagner, & Kunos, 2009a; Overton, Fyfe, & Reynet, 2008).

1.6 Las piperidinas y el 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído

La piperidina es una amina biogénica encontrada en el cerebro de diferentes animales (como anfibios, mamíferos, etc.), y su fisiología ha sido parcialmente estudiada en los procesos como hibernación, vigilia/sueño, emociones y otros procesos cognitivos (Hansen, et al., 2011; Kasé & Miyata, 1976; Miyata, Okano,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Fukunaga, Takahama, & Kasé, 1980; Takahama & Klee, 1990). Las piperidinas parecen estar implicadas principalmente en la regulación del sistema nervioso de los vertebrados (Browning, Ethel, et al., 1990). De hecho, se ha reportado que las piperidinas pueden mediar en la neurotransmisión en invertebrados, lo que indica que estas moléculas tienen una larga historia en el registro evolutivo de la vida (Miyata et al. 1980; Takahama and Klee 1990). Las piperidinas fueron primeramente identificadas como alcaloides en la pimienta y en las toxinas de venenos de los insectos como la hormiga de fuego (Miyata et al. 1980; Kase and Miyata 1976; Zamith-Miranda et al., 2018). Por tanto, estas moléculas se han estudiado primordialmente en el área de toxicología (Chen, Gao, Zou, Xin, & Aisa, 2018). Sin embargo, dado que las piperidinas tienen una amplia gama de actividades biológicas y factibilidad química (Anet and Yavari 1977; Narhe et al. 2017), sus características bioquímicas pueden analizarse en modelos experimentales para determinar sus efectos farmacológicos, proporcionando así nuevas alternativas terapéuticas. En cuanto a sus mecanismos de acción, la evidencia actual sugiere que las piperidinas pueden interactuar con los receptores tipo GPCR, entre ellos los colinérgicos (Takahama y Klee 1990), cannabinoides (Amato, Manke, et al. 2019; Amato, Wiethe, et al. 2019), GABA/glicina (Krogsgaard-Larsen et al. 1980) y receptores de serotonina (Brea et al. 2002), principalmente los localizados en las neuronas (Browning et al. 1990).

El 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído (1-Boc-piperidina) se utiliza como precursor para la síntesis de agonistas selectivos de GPR119 (Neelamkavil et al. 2018), entre otros (Zajdel et al., 2016), así como antagonistas de receptores serotoninérgicos como el 5-HT6 y 5-HT7. Algunos agonistas de GPR119 han sido patentados para el tratamiento de la diabetes, obesidad, dislipidemia y trastornos relacionados (Abdel-Magid, 2019). Los ligandos endógenos para GPR119 pertenecen a N-acilethanolamidas (es decir, endocannabinoides, moléculas similares a endocannabinoides y lípidos no cannabinoides) (Syed et al., 2012). De hecho, GPR119 ha sido discutido como un receptor cannabinoide putativo similar a GPR18 y GPR55 (entre otros) que ejercen acciones que se asemejan a las inducidas por la anandamida y otros endocannabinoides (Guerrero-Alba et al., 2019;

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Marichal, et al., 2016; Ramírez-Orozco et al., 2019). El GPR119 parece expresarse principalmente en el tracto gastrointestinal, en el páncreas de humano y roedor con poca o ninguna expresión en el sistema nervioso central (Chu et al. 2008;). En este sentido, Ray et al. (Ray et al., 2018) reportaron la expresión en el estriado de roedores y el ganglio de raíz dorsal. Sin embargo, no hay ningún informe sobre la funcionalidad de GPR119 específicamente en el SNC.

Aunque el perfil farmacológico de 1-Boc-piperidina está por caracterizarse, pertenece a una familia de moléculas multi-objetivo cuyos posibles efectos terapéuticos han sido poco explorados. Por lo tanto, en la presente tesis de investigación evaluamos los efectos de 1-Boc-piperidina en el comportamiento de atracón y la ansiedad, que son procesos biológicos donde los receptores GABAérgicos, serotoninérgicos, glicinérgicos y receptores GPR119 podrían estar involucrados.

1.7 Fisiología y Farmacología del GPR119

El receptor GPR119, se ha descrito como un receptor huérfano, es decir, no se le ha descrito algún agonista endógeno. Este receptor se encuentra acoplado a una proteína Gs, es de clase A (análogo a rodopsina) y ligado al cromosoma X (Li et al., 2018; Overton et al., 2008; Zhu, Huang, & Qi, 2013).

El GPR119 se expresa de manera predominante en los islotes de Langerhans pancreáticos específicamente en las células beta, así como en las células enteroendocrinas (células K y L) del duodeno e íleon respectivamente (Hansen et al., 2012; Li et al., 2018; Zhu et al., 2013). En las células K y L del tracto gastrointestinal se reporta la producción de incretinas (hormonas intestinales), como el péptido inhibidor gástrico (GIP) liberado por células K, el péptido semejante al glucagón (GLP-1, GLP-2) y péptido tirosina tirosina (PYY) liberados por células L, las cuales son las principales incretinas relacionadas en la activación del GPR119 de células enteroendocrinas (Cvijanovic et al., 2017; Moss et al., 2016; Zhu et al., 2013). Estas hormonas intestinales se liberan principalmente en duodeno (células K) y en íleon y colon (células L) (Cvijanovic et al., 2017; Zhu et al., 2013). Las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

incretinas cuentan con funciones anorexígenas ya que tienen la cualidad de disminuir el apetito, esto mediante diversos mecanismos tanto hormonales como metabólicos, algunos de los cuales pueden ser la estimulación de la secreción de insulina, inhibición de la motilidad gástrica, vaciamiento gástrico, etc. (Hansen et al., 2012; Li et al., 2018; Zhu et al., 2013), lo que da como resultado el equilibrio de la glucemia, la sensación de saciedad y por ende la pérdida de peso.

En investigaciones anteriores se ha visto que el GPR119 es activado por ácidos grasos (fosfolípidos de membrana) (figura 3), funcionando como un tipo de sensor de grasa, siendo el principal ligando endógeno la oleiletanolamida (OEA), y algunos otros derivados del ácido oleico como son la 1-oleoil-lisofosfatidilcolina generada en el tejido intestinal y la 2-oleoil-glicerol (2-OG) generado en luz intestinal (Cvijanovic et al., 2017; Hansen et al., 2012; Moss et al., 2016; Overton et al., 2008). No obstante, en la literatura también se puede observar que la OEA al parecer no actúa en primera instancia sobre el receptor, sino que lo hace de modo paracrino o autocrino, por medio de los receptores TRPV1 (receptor de potencial transitorio vanilloide tipo 1, *por sus siglas en inglés*) y PPAR α (receptor proliferador de peroxisomas α, *por su abreviatura en inglés*) los cuales se cree moderan efectos biológicos de GPR119 (Hansen et al., 2012; Overton et al., 2008; Zhu et al., 2013).

La liberación del GLP-1 en las células enteroendocrinas, como se ha descrito, se encuentra regulada por los ácidos grasos libres, sin embargo, aún en mayor cantidad se encuentra mediada por la síntesis luminal de 2-monoacilglicerol, formado mediante el recambio de triacilglicerol pancreático obtenido de la dieta, el cual participa en la activación del GPR119, como se observa en la figura 3 (Hansen et al., 2012). Esta estimulación de GLP-1 mediante la activación de GPR119 conlleva a un aumento de síntesis de insulina dependiente de dextrosa en las células β del páncreas y GLP-1 en células L enteroendocrinas (Hansen et al., 2012; Li et al., 2018; Tyurenkov et al., 2018).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

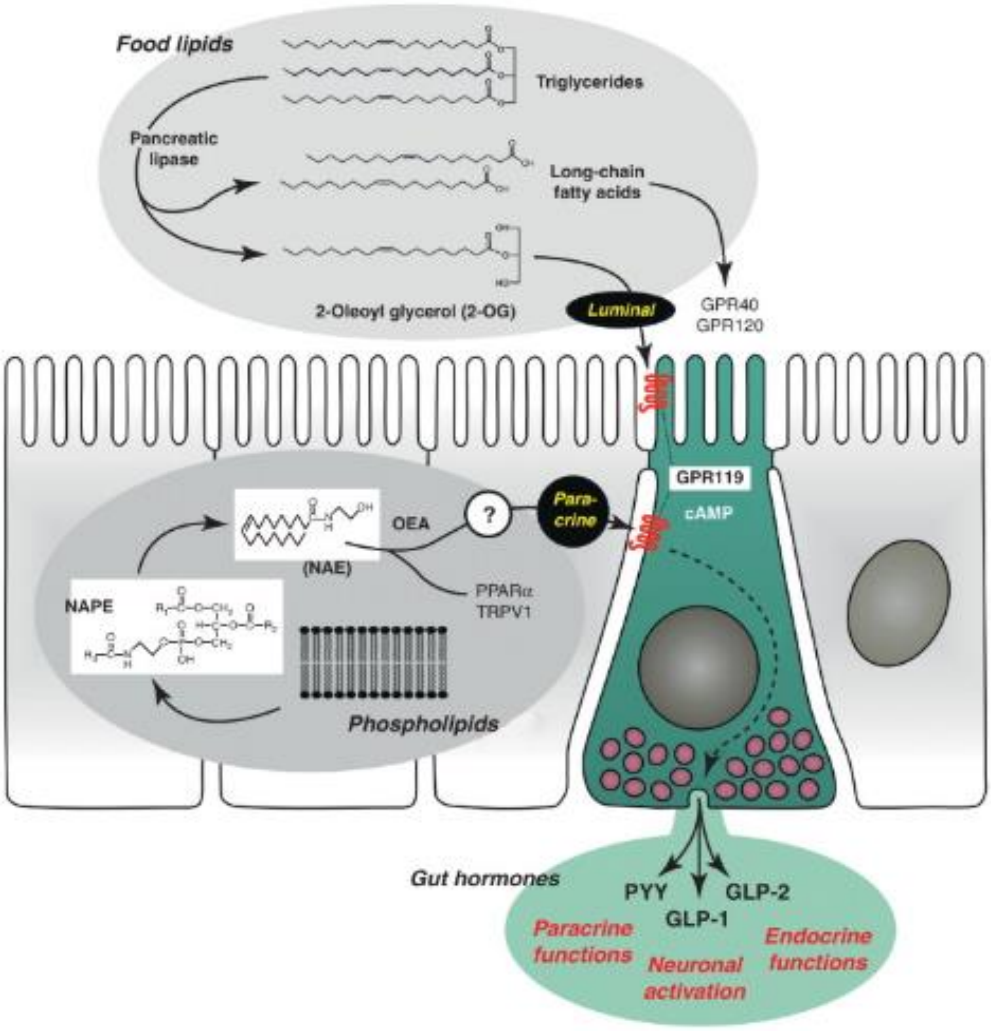


Fig. 3. Activación de GPR119 por los lípidos de la dieta.

Figura 3. Activación de GPR119 mediante los lípidos de la dieta**.** Se observa la probable acción luminal y paracrina de los ligandos endógenos OEA y 2-OG para GPR119 como posible detector de grasa, importante en el sistema entero endócrino que regula la expresión y secreción de hormonas intestinales como GLP-1, -2, PYY y GIP. Tomado de (Hansen et al., 2012).

Tras la liberación de GIP y GLP-1 y la activación del GPR119 en células enteroendocrinas, el GLP-1 promueve a una disminución del vaciamiento gástrico, sensación de saciedad y reducción del peso corporal, mientras que el GIP activa la síntesis de insulina que es dependiente de glucosa, lo que ocasiona como resultado el equilibrio de la glucemia y supresión del apetito (Hansen et al., 2012; Moss et al., 2016; Tyurenkov et al., 2018; Zhu et al., 2013). Por otra parte, GLP-1 también puede estimular la síntesis insulínica en las células β del páncreas (Zhu et al., 2013).

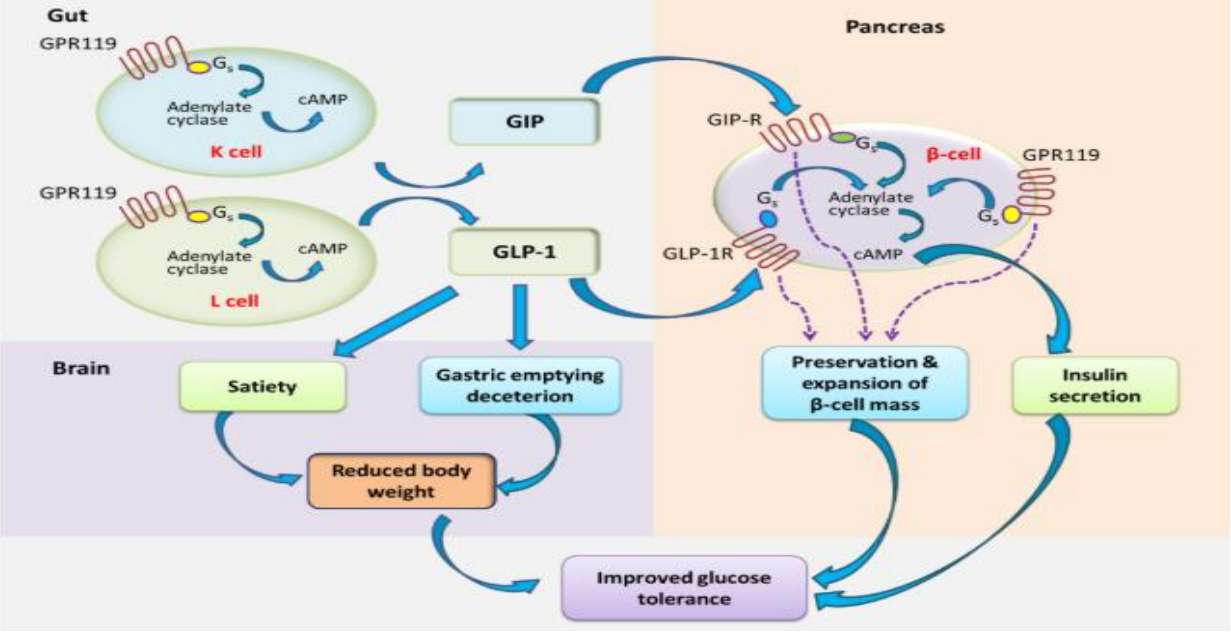
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Al parecer ambas hormonas promueven la síntesis de insulina de una manera dependiente de la glucosa, esto mediante el incremento en la producción de AMPc mediado por la adenilato ciclasa (Moss et al., 2016; Zhu et al., 2013). Adicionalmente, la secreción de GLP-1 por los enterocitos se encuentra inducida por los lípidos de la dieta (Hansen et al., 2012; Moss et al., 2016).

La liberación de la insulina también puede ser estimulada por la activación directa del receptor GPR119 de las células β pancreáticas (Hansen et al., 2012; Zhu, et al., 2013), de igual manera mediada por la activación de adenilato ciclasa y la acumulación de AMPc dependiente de glucosa (Hansen et al., 2012; Zhu, et al., 2013), lo que resulta en la preservación y expansión de la masa de las células β, incremento en la producción de insulina y una mejor tolerancia a la glucosa, tal y como se puede observar en la figura 4 (Hansen et al., 2012; Tyurenkov et al., 2018; Zhu et al., 2013).

Sin embargo, la evidencia sugiere que la producción de insulina mediante la acción directa sobre las células β es modesta (Zhu, et al., 2013), es decir, que la producción de insulina generada por la activación del GPR119 se debe en mayor parte a la acción de las incretinas, más que de la acción directa de las células β pancreáticas activadas por la estimulación del GPR119 (Hansen et al., 2012; Tyurenkov et al., 2018; Zhu et al., 2013).



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 4. Ilustración de las posibles acciones de los agonistas de GPR119. El GPR119 se expresa en células intestinales y pancreáticas, en las células de ambos tipos, la estimulación de GPR119 por un agonista conduce a la activación de adenilato ciclasa y a un aumento de AMPc, lo que conlleva a la liberación de incretinas como GLP-1,-2, PYY y GIP y a su vez un aumento en la liberación de insulina. Tomado de (Zhu et al., 2013).

Estudios previos han sugerido que el recambio de triacilglicerol en las células β se encuentra relacionado con la secreción de insulina dependiente de glucosa (Hansen et al., 2012). Gracias a este recambio, el triacilglicerol es hidrolizado a diacilglicerol mediante el triglicérido adiposo lipasa (ATGL), y a su vez el diacilglicerol es hidrolizado a 2-monoacilglicerol gracias a la lipasa sensible a hormonas (HSL) (Hansen et al., 2012). De tal manera, el 2-OG el cual es un derivado del 2-monoacilglicerol, como ya se ha mencionado anteriormente, es un potente ligando endógeno de GPR119 el cual tiene la capacidad de activar la liberación de insulina dependiente de glucosa (Hansen et al., 2012; Moss et al., 2016; Zhu et al., 2013). No obstante, se ignora si realmente el 2-monoacilglicerol activa de manera directa al GPR119, por lo cual es de suma importancia la investigación con el uso de antagonistas selectivos (Hansen et al., 2012).

Aunado a esto, se ha demostrado que la tasa de secreción de la insulina además de involucrar un incremento en la acumulación de AMPc originado por la estimulación de adenilato ciclasa también depende del bloqueo de los canales de K^+ sensibles al ATP y a su vez la excitación de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje (Hansen et al., 2012; Moss et al., 2016; Zhu et al., 2013).

Cabe destacar que en publicaciones recientes se ha observado que, durante la hipoglucemia inducida por la insulina, la estimulación del GPR119 aumenta los niveles de glucagón en plasma, gracias a una mayor actividad de las células α que de células las β pancreáticas (Li et al., 2018).

Debido a ello, el GPR119 se ha estudiado como un blanco potencial para tratar la obesidad, esto debido a sus posibles efectos terapéuticos en contra de las comorbilidades de la DM2, ya que se ha demostrado que el uso concomitante de fármacos utilizados para la diabetes y un agonista del receptor disminuye la posibilidad de una hipoglucemia ocasionada por la insulina liberada, además de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

afortunados efectos pleiotrópicos como la pérdida de peso, supresión del apetito, neuroprotección, etc. (Cvijanovic et al., 2017; Hansen et al., 2012; Li et al., 2018; Overton et al., 2008; Tyurenkov et al., 2018; Zhu et al., 2013). Por ello, es de gran importancia el estudio farmacológico y el potencial terapéutico del receptor GPR119.

El GPR119 se ha visto como blanco de estudio debido a sus efectos neuroendocrinos; disminuye el consumo de alimentos, mejora la constitución corporal de las ratas, preservación de las células β pancreáticas, promoción de la síntesis de insulina dependiente de glucosa y GLP-1 enteroendocrino, todo ello sin riesgo de una hipoglucemia en el tratamiento de la DM2 (Ramírez-Orozco et al., 2019; Yang, Kim, Choi, Kim, & Kang, 2018).

Algunos ligandos endógenos para GPR119, sintetizados a partir de los fosfolípidos de membrana han sido identificados; AEA, PEA, oleoiletanolamida (OEA), 2-oleoil glicerol (2-OG), y 1-oleoil glicerol (1-OG) entre otros, sin embargo, a la fecha, no se ha identificado ningún cannabinoide que posea una fuerte actividad sobre el receptor (Ramírez-Orozco et al., 2019; Yang et al., 2018). Para motivos de la presente investigación se utilizaron dos agonistas, PEA y uno sintético: 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído (1-Boc).

La PEA, se ha estudiado en gran medida debido a sus efectos analgésicos y antiinflamatorios (Artukoglu, Beyer, Zuloff-Shani, Brener, & Bloch, 2017; Gabrielsson, Mattsson, & Fowler, 2016; Marichal, et al., 2016). Este compuesto cannabinomimético es producido de forma natural en plantas y animales utilizados como alimentos, incluyendo células y tejidos de mamíferos (Petrosino & Di Marzo, 2017).

Por otro lado, PEA tiene efectos sobre la regulación del metabolismo, control de liberación de insulina, disminución de masa grasa y disminución del apetito al tener una afinidad por receptores metabotrópicos como el GPR55 y GPR119 (Ramírez-Orozco et al., 2019; Yang et al., 2018), funciones mediadas por la activación de adenilato ciclasa y el aumento de síntesis de AMPc (Hansen et al., 2012; Yang et al., 2018; Zhu, et al., 2013), sin embargo, se ha observado que el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

receptor GPR119 posee una menor afinidad (Ramírez-Orozco et al., 2019). Lo que sugiere que la PEA podría ser un importante anorexígeno implicado de manera directa o indirecta con el receptor GPR119.

En modelos murinos el bloqueo farmacológico de GPR119 y GPR55 tiene efectos sobre el metabolismo; disminución de los niveles de insulina plasmática, disminución de la masa magra, disminución en la liberación de GLP-1, además de inducir un aumento de grasa corporal, descenso del gasto energético, disminución de la actividad física y resistencia a la insulina (Ramírez-Orozco et al., 2019).

A pesar del esfuerzo invertido por muchas farmacéuticas para sintetizar agonistas de GPR119 para tratar enfermedades como DM2, hígado graso no alcohólico (NAFLD) y prevenir padecimientos como el sobrepeso-obesidad y el SM (Hansen et al., 2012; Park et al., 2017; Yang et al., 2018; Zhu, et al., 2013), solo algunos de los compuestos han logrado pasar a la fase 1 (por ejemplo JNJ-38431055 (APD597), BMS-903452, etc.) mientras que la mayoría no pasan de la fase 2 de investigación en estudios clínicos (por ejemplo DS-8500a, PSN821, etc.) (Yang et al., 2018).

Por otro lado, muchas otras compañías han logrado desarrollar ligandos sintéticos para el receptor, tales como Bristol-Myers Squibb, farmacéutica Arena, Daiichi Sankyo, entre otras. Algunos de sus compuestos representativos aprobados para GPR119 son: PSN375963, AR231453, AS1269574, GSK1104252A, HD0471042, entre otros (Yang et al., 2018).

2. Antecedentes

Entre la década de los 80s a la actualidad, la obesidad se ha duplicado en mujeres y triplicado en hombres a nivel mundial, teniendo progresivamente un mayor impacto en la población infantil a lo largo de este tiempo (CCC, 2017). Los problemas de salud en México provocados por la obesidad secundaria a una alimentación inadecuada y una actividad física reducida han ido aumentando de manera acelerada, incrementando la incidencia de una mayor cantidad de patologías como; la DM2, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

arterial y el síndrome metabólico, que engloba el conjunto de estos padecimientos. En México, 7 de cada 10 personas sufren de sobrepeso y 3 de cada 10 de obesidad, (IMC ≥ 25 y ≥ 30, respectivamente) (ISSSTE, 2016). Debido a esto, el padecimiento de las patologías resultado de la obesidad no solo representa un problema grave de salud pública, sino también un gran costo, en este sentido, México destina un gasto medio de 200 millones de dólares al año para tratar estas patologías (OCDE, 2017). Toda esta situación resalta la importancia y la necesidad de investigar nuevas estrategias terapéuticas-preventivas para el control de la obesidad y el síndrome metabólico.

Los cannabinoides (CB) son moléculas producidas únicamente por la planta de la marihuana (*Cannabis sativa*), siendo el THC descubierto en la década de los 60s, la molécula más importante. Para este estudio, sobresalen sus efectos nerviosos (Calabrese & Rubio-Casillas, 2018). En 1992 se descubrió que el organismo produce sus propios cannabinoides, llamados cannabinoides endógenos, derivados del ácido araquidónico y anandamida (AEA y el 2-AG) (Guzmán & Galve-Roperh, 2009).

Fisiológicamente, el sistema endocannabinoide es un complejo sistema de regulación conformado por los endocannabinoides, sus receptores específicos, así como de un sistema de neurotransmisión en el que están implicados aspectos motores, de aprendizaje y alimentación. (Guzmán & Galve-Roperh, 2009).

Se han identificado dos tipos de receptores cannabinoides (CBR); el CB1 y el CB2, los cuales fueron llamados receptor central (CB1) y receptor periférico (CB2) respectivamente. El CB1 está relacionado con aspectos de control motor, emociones, aprendizaje, sensaciones y actividades autonómicas, mientras que el CB2 se relaciona con el sistema inmune (Franjo Grotenhermen, 2006).

Se han propuesto otros receptores metabotrópicos que interactúan con cannabinoides (por ejemplo, GPR55 y GPR119); no obstante, actualmente se consideran como receptores putativos a cannabinoides debido a que no se ha logrado alcanzar un consenso sobre si debiesen ser considerados formalmente como receptores cannabinoides (Godlewski, Offertáler, Wagner, & Kunos, 2009b).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Hasta hace algún tiempo se le comenzó a tomar mayor interés al receptor GPR119, esto gracias a su capacidad de regular la actividad homeostática del organismo, equilibrando la glucemia sanguínea, ingesta de alimentos, volumen corpóreo y posiblemente manteniendo en un estado óptimo y funcional a las células β pancreáticas, esto gracias a experimentaciones *in vitro* en modelos animales (Overton et al, 2008). Por lo cual se ha investigado a la GPR119 como un regulador positivo para el control de la DM2 y la obesidad.

3. Justificación

El problema de la obesidad y el SM en México continúa aumentando. Al presente, el 72.5% de los adultos padecen de sobrepeso y obesidad, y es el segundo país a nivel mundial con prevalencia de obesidad del 32.4%. secundario a malos hábitos alimenticios y pobre actividad física (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, 2017). Todo esto ha ocasionado cambios en la constitución corporal de los mexicanos, seguido de una serie de alteraciones metabólicas que son perjudiciales para la salud (por ejemplo, síndrome metabólico), resultando enfermedades como DM2, dislipidemia, hipertensión y paulatinamente creándose un gran problema para la salud pública. Por ejemplo, la DM2 catalogada como la segunda causa de decesos en el país, registró cerca de 106,500 personas fallecidas por año entre el 2015-2018 según INEGI, así mismo, representa un gran costo en servicios médicos, mismos que han aumentado significativamente en los últimos años (586 millones de pesos para gastos en salud pública en el 2016) (Carretto, 2018). En investigaciones previas se ha visto que el receptor putativo a cannabinoide GPR119 se expresa en lugares como las células enteroendocrinas del intestino delgado y las células β pancreáticas, y se ha relacionado con comidas abundantes y elevadas en grasas, provocando una serie de cambios hormonales y metabólicos que inducen la sensación de satisfacción en la ingesta de alimentos (Godlewski et al, 2009 y Grotenhermen, 2006). Por lo anterior, es de gran relevancia investigar la activación exógena del receptor GPR119 utilizando un agonista selectivo, con el fin de evaluar si esto promueve a una reducción en el consumo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

calórico y en la masa corporal y por ende una reducción significativa al riesgo de daño metabólico por la obesidad y dietas hipercalóricas. Si esto es así, estaremos abriendo un campo de investigación original para el tratamiento de la obesidad y sus secuelas, así como de un gran avance a la salud pública en la prevención de la obesidad.

4. Hipótesis

- El 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído:

(i) Inhibirá el comportamiento de atracón de alimentos, ansiogénico y disminuirá el peso corporal de las ratas (posiblemente a través del GPR119).

(ii) Producirá un posible efecto hepatotóxico resultado de su administración crónica.

(iii) Presentará en la estimación *in silico* algún nivel de afinidad por los receptores GPR119(cannabinoide), 5HT-6 y 5HT-7 (serotoninérgicos).

(iv) Solo o en combinación con la palmitoiletanolamida disminuirá el incremento de masa corporal y la preferencia por alimento hipercalórico en ratas pre-obesas inducido por dieta de cafetería.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la seguridad hepática y el posible efecto anti-obesogénico del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído en modelos preclínicos de obesidad.

5.2 Objetivos particulares

1. Evaluar los efectos del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído sobre la conducta de atracón de alimentos, el incremento de masa corporal y la ansiedad.
2. Estudiar el posible efecto hepatotóxico derivado del uso crónico del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3. Estimar *in silico* la capacidad del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehido para interactuar con los receptores huérfanos GPR119 y serotoninérgicos 5-HT6 y 5-HT7.
4. Evaluar el posible efecto terapéutico del 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehido y la palmitoiletanolamida (agonista no selectivo GPR119) solos o en combinación sobre el incremento de masa corporal y el comportamiento alimenticio de animales pre-obesos expuestos a dieta de cafetería.

6. Materiales y Métodos

6.1 Animales

Se emplearon 80 ratas Wistar con un peso al inicio de los experimentos de 90-110 g. Todas las ratas utilizadas en este estudio se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (luz que comienza a las 07:00 am), se mantuvieron a una invariable temperatura de (22°C) y con una humedad del 50 %. Los grupos separados recibían comida y agua *ad libitum*.

Todos los protocolos experimentales se realizaron con el permiso del Comité de Ética Institucional y en estricto apego a las normas nacionales e internacionales para el uso de animales de laboratorio de Estados Unidos de Norte América y de la *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments* (ARRIVE) (Bayne, 1996; McGrath, Drummond, McLachlan, Kilkenny, & Wainwright, 2010).

6.2 Compuestos y alimentos utilizados

El 1-Boc-piperidina (1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído) y metanol se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). 1-Boc-piperidina se disolvió en metanol al 10%. Es importante destacar que, como el volumen de inyección para tratamientos fue de 1 ml/kg, intraperitoneal, la cantidad total de metanol que recibieron las ratas fue de alrededor de 20 µg tres veces por semana. Nota: aunque el metanol es un vehículo que puede plantear algunas preocupaciones debido a su capacidad para ejercer efectos nocivos, las dosis

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tóxicas en roedores son 500 veces más altas (Moral, Çankayalı, Sergin, & Boyacılar, 2015; Yazgan et al., 2017) que la dosis utilizada en el presente estudio (por ejemplo, LD50 en ratas =9.5 g/kg) (Röe, 1982).

En cada experimento se utilizaron soluciones recién preparadas. El anestésico utilizado para sacrificar animales al final del estudio fue isoflurano (Sofloran®, Laboratorios PiSA S.A. de C.V., Guadalajara, Jal., México). La dieta estándar se obtuvo de Agribrands Purina México, S.A. de C.V., Ciudad de México, México). En cuanto a los alimentos hipercalóricos, se utilizaron galletas Oreo® (NABISCO®, Mondelez México, S. de R. L. de C. V., Ciudad de México, México).

6.3 Métodos generales

Para cumplir con el objetivo general se diseñaron dos bloques experimentales: (i) en el bloque I, se evaluó el efecto del 1-Boc-piperidina sobre la conducta de atracón de alimentos hipercalóricos y sobre la ansiedad (usando como paradigma el laberinto en cruz elevado). Una vez terminada la fase experimental, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de isoflurano. Por último, se realizó un estudio *in silico* en colaboración con el grupo del Dr. Marvín Soriano Ursúa de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional para analizar la potencial interacción del 1-Boc-piperidina con los receptores GPR119, 5HT-6 y 5HT-7 mediante la técnica de *docking* y modelado molecular; y (ii) en el bloque II, se evaluó el efecto del 1-Boc-piperidina y la palmitoiletanolamida solos o en combinación sobre el incremento de la masa corporal y el daño metabólico en animales con obesidad inducida por dieta de cafetería.

6.4 Análisis estadístico

En la sección de resultados se representa el análisis obtenido de la correspondiente ANOVA de acuerdo a la prueba de Hartley, expresando para cada resultado: los grados de libertad de la n total-1, los grados de libertad del residual-1

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y el valor obtenido de ‘’F’’ que nos indica la variación entre grupos y la probabilidad de existir o no diferencia entre estas variaciones. Los datos se analizaron estadísticamente con un nivel significativo de $P < 0.05$, todos los datos de las cifras se presentan como la media ± SEM. Los gráficos y el análisis estadístico se desarrollaron con GraphPad Prism, versión 6. Las diferencias en los valores de los cambios porcentuales de peso corporal se analizaron mediante una prueba ANOVA bifactorial. El consumo de galletas (kcal/min) se analizó mediante una prueba ANOVA bifactorial de medidas repetidas. Para EPM (laberinto en cruz elevado, *por sus siglas en inglés*), el tiempo en brazos abiertos o cerrados, y las entradas en brazos abiertos o cerrados se evaluaron utilizando ANOVA unifactorial. Se empleó el procedimiento de comparación múltiple post hoc de Holm-Sidak o Dunnett para todos los experimentos.

6.5 Bloque I

6.5.1 Prueba de atracón de alimentos

En este modelo, se indujo la conducta de atracón de alimentos provocando un estrés moderado mediante el modelo de la ‘cama inclinada a 45°’ y ‘ruido blanco a 100dB’, durante 20 minutos antes de cada exposición al alimento hipercalórico (galletas oreo). El procedimiento se repitió en todos los grupos por 6 semanas los días lunes, miércoles y viernes en ausencia o presencia del pretratamiento con 1-Boc-piperidina (Figura 5). Posteriormente, se evaluó la ingestión calórica de los alimentos (provenientes tanto de la dieta estándar como del alimento hipercalórico), el posible efecto ansiolítico y el potencial efecto hepatotóxico del fármaco.

Para esta prueba, 24 ratas Wistar hembra (de entre 90 -110 g) se dividieron en los siguientes grupos: vehículo (metanol 10%, n=6); y dos grupos tratados con 1-Boc-piperidina: grupo i) (1 $\mu mol.kg^{-1}$, n=6); grupo ii) (10 $\mu mol.kg^{-1}$, n=6). El grupo control no recibió tratamiento alguno. Todas las administraciones fueron por vía intraperitoneal los lunes, miércoles y viernes durante 6 semanas. Se utilizó el modelo del atracón de alimentos (figura 5), en donde todos los grupos fueron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sometidos al tratamiento con 1-Boc-piperidina y con dieta alta en grasas 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) 2 h por día durante el primer par de semanas (siempre durante el ciclo de luz); a partir de la cuarta semana se les redujo el tiempo de contacto con los alimentos grasos en 30 min por semana (semana 1, 2, y 3 =2h; semana 4 =1.5h; semana 5 =1h; semana 6 =30min). Todos los grupos con excepción del control recibieron, a libre demanda, alimento estándar (pellets)+galletas oreo, durante el periodo de tratamiento (figura 5). El tiempo restante todos los grupos recibieron alimento estándar.

Antes de las inyecciones, las ratas de todos los grupos fueron sometidas a estrés durante 20 min: método de la cama inclinada y ruido blanco como se describió previamente. De los resultados obtenidos se dedujo que el modelo de estrés y conducta de atracón con dieta hipercalórica fue inducido adecuadamente, por lo que este modelo se utilizó en el presente proyecto.

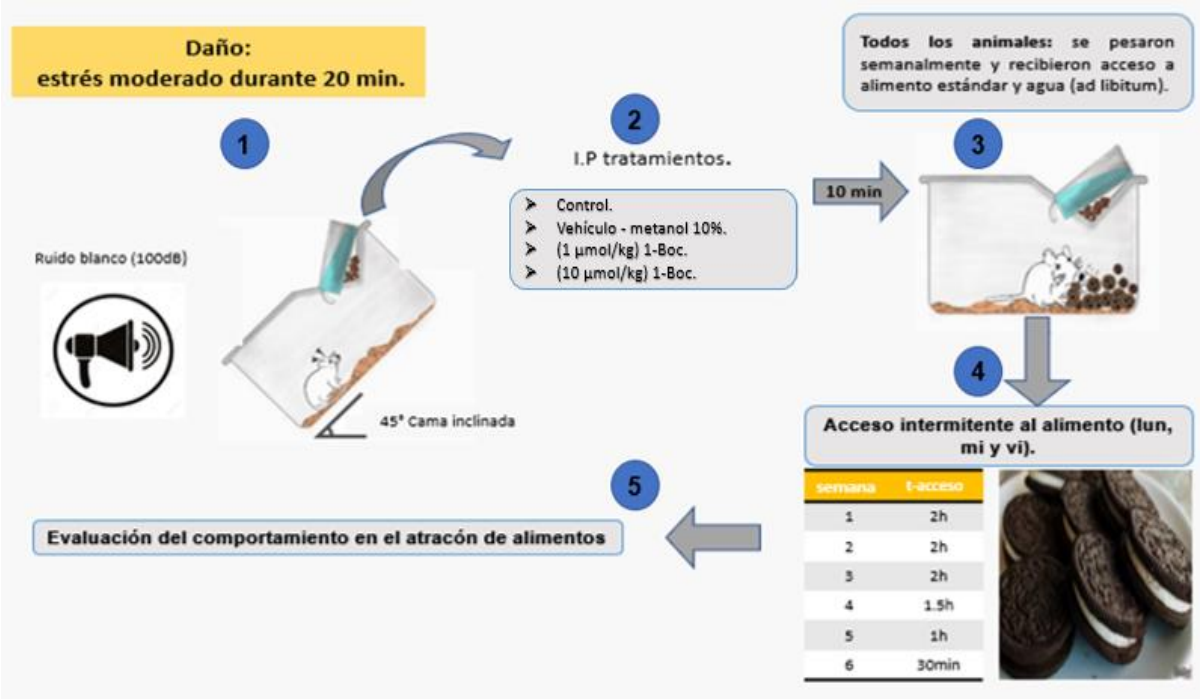


Figura 5. Protocolo de atracón de alimentos en la rata. Se muestra el protocolo que se llevó a cabo para el experimento del comportamiento de atracón, con un modelo de estrés cama inclinada 45° y ruido blanco de 100 decibeles (dB), administración de tratamientos con 1-Boc-piperidina-4-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

carboxaldehido (1-Boc) de forma intraperitoneal y acceso en tiempo limitado al alimento chatarra los días lunes, miércoles y viernes durante un periodo de seis semanas.

Durante todo el procedimiento experimental se recolectaron datos de peso y calorías ingeridas de todos los grupos de manera semanal para evaluar el efecto de los tratamientos con y sin 1-Boc-piperidina.

6.5.2 Prueba de ansiedad, laberinto en cruz elevado

Para este experimento se utilizaron 24 ratas Wistar macho, esto con el fin de evitar el efecto ansiogénico que naturalmente suele ser mayor en ratas hembra que en machos, con un peso inicial de 90-110 g (Manwell et al., 2019).

El laberinto consiste en dos brazos abiertos (50 x 10 cm) y dos brazos cerrados (50 x 10 x 50 cm), situados en una habitación con una luz blanca tenue: 100 y 50 lúmenes en los brazos abiertos y cerrados respectivamente (Casarrubea et al., 2013). Los brazos abiertos y cerrados forman una cruz y el laberinto fue elevado 80 cm del suelo, el laberinto se localiza en el centro de una sala de pruebas tranquila y cada sesión fue video grabada. Las ratas fueron colocadas individualmente en medio del laberinto señalando hacia uno de los lados abiertos y se les permitieron 5 minutos para la exploración. Después de cada prueba, el laberinto se limpió con solución de etanol al 30 % y se secó para evitar la influencia de cualquier olor. Se midió el tiempo que el animal pasó en las secciones abiertas, el plazo invertido en las secciones cerradas y se contaron el número de entradas a cualquier brazo. La actividad del brazo abierto y cerrado se cuantificó como el porcentaje de tiempo de brazo abierto o cerrado invertido (tiempo en las áreas abiertas o cerradas / tiempo en las áreas abiertas + cerradas X 100), y se consideró como una entrada de (n) brazo si las cuatro patas de los animales se encontraban dentro del brazo.

En este sentido la ansiedad se consideró directamente proporcional a los ingresos en las áreas abiertas y/o la proporción de tiempo pasado en las áreas abiertas (Pellow, Chopin, File, & Briley, 1985).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los animales recibieron estrés leve (es decir, una jaula inclinada en un ángulo de 45° y un ruido blanco a 100 dB) durante 20 minutos (figura 6). Después de la exposición al estrés, los animales recibieron inyecciones i.p de (a) vehículo (metanol 10%; n=6); (b) 1-Boc-piperidina (1 µmol.kg^{-1}; n=6); y (c) 1-Boc-piperidina- (10 µmol.kg^{-1}; n=6). 10 minutos después, las ratas se evaluaron en el laberinto en cruz elevado (figura 6).

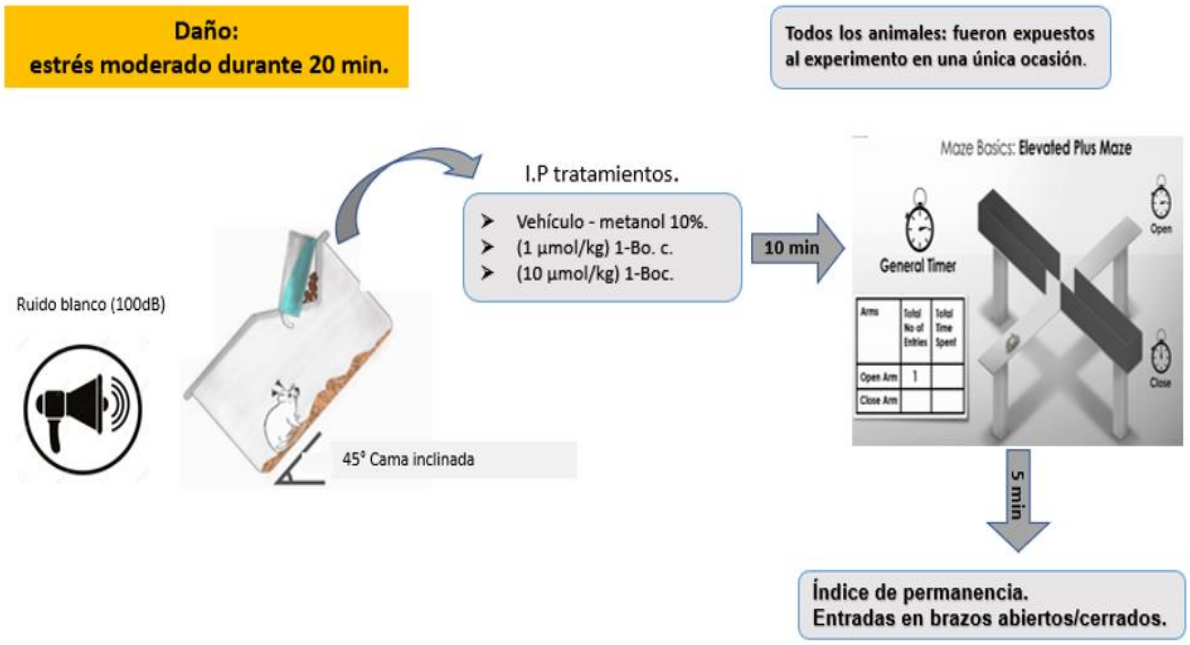


Figura 6. Prueba de ansiedad.

Figura 6. Protocolo para la prueba de ansiedad. Se muestra el protocolo utilizado, estrés leve (cama inclinada con ruido blanco de 100 decibeles) durante 20 minutos, administración intraperitoneal (I.P) de tratamientos con 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehido y finalmente evaluación conductual en el laberinto elevado en forma de cruz.

6.5.3 Estudio *in silico*

Debido a la falta de caracterización del 1-Boc-piperidina, y con el fin de estudiar su viabilidad para interactuar y actuar en GPR119 y los receptores de serotonina 5-HT6 y 5-HT7 como agonista, se realizaron ensayos de modelado molecular y acoplamiento *in silico*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los agonistas de los GPCRs específicos que se han estimado con valores experimentales de afinidad, potencia y/o eficacia se recopilaron de la base de datos IUPHAR/BPS y de artículos recientes (Tadaki et al., 2019). Las estructuras de los ligandos se dibujaron utilizando ChemBioDraw Ultra 12.0. Su geometría se pre optimizó mediante el uso de Hyperchem (Versión 6.0, Hypercube, EE.UU., http://www.hyper.com) a nivel de la mecánica molecular (conjunto de bases AM1, Figura 20). La estructura energética mínima para cada ligando se optimizó completamente en el nivel B3LYP/6-31G** empleando el software Gaussian 09 (M.J. Frisch et al., 2009). Después, se modelaron los receptores de rata (*Rattus novergicus*), utilizando datos de la base de datos NCBI-proteína (código de GenBank: AAP72138.1 para GPR119, NP_077341.2 para 5-HT6 y NP_075227.1 para 5-HT7) y el servidor de modelos suizos (Waterhouse et al., 2018). Los modelos moleculares 3D obtenidos fueron evaluados, luego los ligandos se ensayaron mediante un procedimiento de acoplamiento con AutoDock Tools 1.5.2 en el mejor modelo juzgado por puntajes de evaluación. En primer lugar, se empleó un enfoque ciego para explorar la unión en cada el receptor entero y así identificar o descartar sitios de unión alostéricos putativos. En segundo lugar, una cuadrícula de 70x70x70 Å se centró en el lugar putativo del receptor que implica residuos conservados en los dominios transmembrana tercero y sexto. Se usó un algoritmo genético Lamarckiano para realizar la búsqueda con una población inicial de 100 individuos aleatorios, y se ejecutaron 1.0×10^7 interacciones mediante el programa AutoDock 4.2.6 (Morris et al., 2009). Los resultados se analizaron utilizando AutoDock Tools y el software VMD 1.9.2 para determinar las posturas de unión y la afinidad como en otros lugares (Soriano-Ursua et al. 2015).

Los resultados fueron analizados con AutoDock Tools (Morris et al., 2009) y Visual Molecular Dynamics 1.9.3 con el fin de determinar las posturas de unión y las puntuaciones de energía y afinidades (Tabla 6), las imágenes se obtuvieron utilizando este último programa (Humphrey, William., Dalke, Andrew., Schulten, 1996).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6.5.4 Análisis bioquímico

Para la evaluación del efecto toxicológico y el posible daño hepático del 1-Boc-piperidina, así como sus posibles funciones en la homeostasis de la glucosa y regulación energética, se examinaron los niveles de glucosa, alanina y aspartato aminotransferasas sanguíneo.

Al final del tratamiento experimental se analizó el posible efecto toxicológico de los fármacos y/o de la dieta. Veinticuatro ratas de los grupos: control, vehículo, Tx2 (1 µmol.kg-1 de 1-Boc-piperidina) y Tx3 (10 µmol.kg-1 de 1-Boc-piperidina)(6 animales/grupo), fueron utilizadas para evaluar el efecto toxicológico y el posible daño hepático del 1-Boc-piperidina, así como sus posibles funciones en la homeostasis de la glucosa y regulación energética. Las ratas se sacrificaron como se describió previamente; se abrió el tórax y se tomaron muestras de sangre del corazón (3 ml), las cual fueron centrifugadas a 1500 RPM durante 15 minutos y los sueros separados. Mientras que los niveles de glucosa fueron medidos de inmediato, las alícuotas de suero restantes se congelaron a -80°C para su evaluación posterior. Los métodos para medir las diferentes variables se tomaron de las instrucciones indicadas por el fabricante de los estuches: glucosa, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa (Biosystems).

6.6 Bloque II

6.6.1 Modelo de obesidad inducida por dieta de cafetería

Para el cumplimiento del objetivo tres para inducir la obesidad, se utilizó el modelo de “dieta de cafetería” en el cual se evaluó el efecto del 1-Boc-piperidina y palmitoiletanolamida (PEA agonista no selectivo de GPR119) solos o en combinación sobre el incremento de masa corporal, la preferencia de alimentos y el daño metabólico.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Este modelo de obesidad consiste en mantener a las ratas expuestas de manera continua al alimento de cafetería. Para esto, se fabricaron croquetas de 200 gr c/u con una mezcla de galletas “tipo María” (300gr), chocolate Hershey en líquido (200gr), polvo de pellets de alimento para rata (300gr), embutidos (400gr) y manteca de cerdo (200gr). El alimento se preparó triturando los ingredientes sólidos por separado (galletas), y los embutidos en una licuadora y los pellets en un molino de café, posteriormente todos los ingredientes se amasaron hasta obtener una masa homogénea de la cual se prepararon las croquetas. Durante 8 semanas los grupos tuvieron acceso ad libitum al alimento de cafetería, alimento estándar (pellets) y agua. Todos los días se analizaban las calorías consumidas por cada grupo. Los animales de todos los grupos fueron pesados antes de iniciar el experimento y cada 8 días hasta la terminación de este.

6.6.2 Criterios de selección para la susceptibilidad a la obesidad

Treintaidós ratas Wistar hembras alojadas en grupos de 16 animales por caja fueron expuestas a dieta estándar, agua potable y dieta de cafetería por 5 semanas. Se registró el incremento de masa corporal semanalmente y durante 5 semanas. En la semana 1, se sacó la media del valor de masa corporal de las 32 ratas y dicho valor se fijó como punto de división para clasificar a los animales en: resistentes a la obesidad (cuando el incremento durante la semana 1 fue menor al valor de la media) o susceptibles (cuando dicho valor fue superior o igual a la media). Resultando en 20 ratas susceptibles y 12 resistentes.

6.6.3 Tratamiento farmacológico

Veinte ratas hembra Wistar susceptibles a la obesidad por dieta de cafetería se agruparon aleatoriamente en 4 grupos (n= 5 cada uno) que recibieron alguno de los siguientes tratamientos: (i) vehículo; (ii) PEA); (iii) 1-Boc-piperidina; y (iv) Mix (*i.e*., PEA + 1-Boc-piperidina). Todos los grupos tuvieron acceso a agua, al alimento

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

estándar y a la dieta de cafetería de manera *ad libitum.* La vía de administración de los tratamientos fue intraperitoneal cada 24 h durante los 21 días que duró el experimento (figura 7). Los tratamientos fueron administrados en un volumen total de 200 µL, de los cuales PEA contenía (0.16 µmol), 1-Boc-piperidina (2 µmol), vehículo con DMSO al 5% y metanol al 1.3%, y el Mix que era la combinación de las dosis de PEA + 1-Boc-piperidina, tal como se muestra en la figura 7. Se recolectaron datos de peso semanal y conteo de calorías consumidas diariamente para constatar la preferencia de alimento.

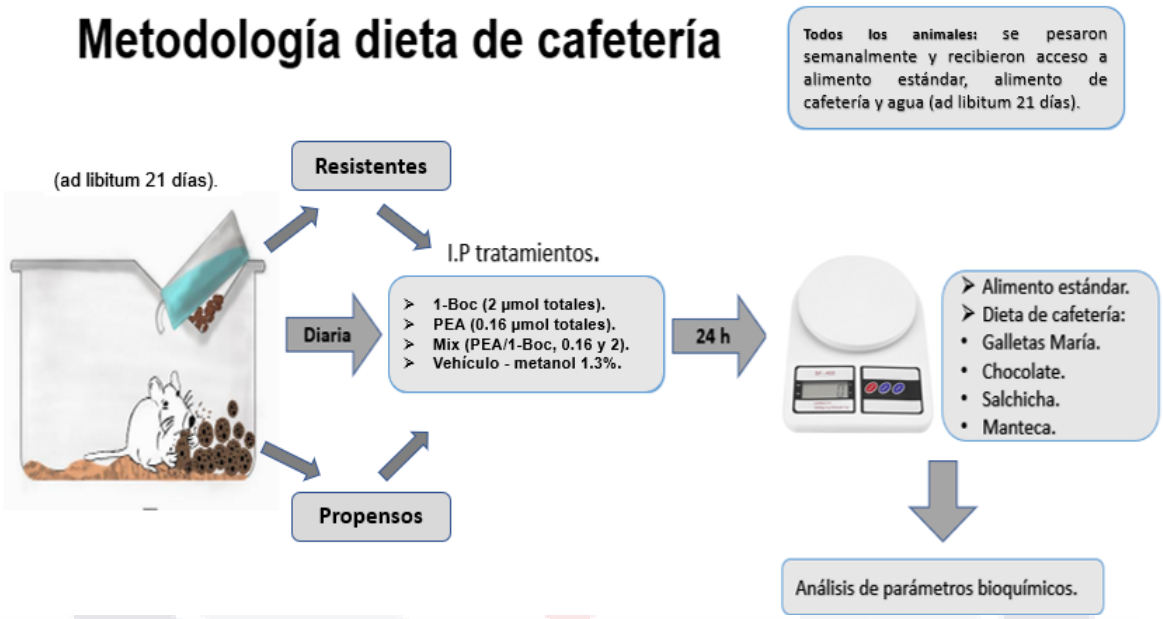


Figura 7. Protocolo de dieta de cafetería. 1-Boc-piperidina, 1-Boc-piperidina-piperidine-4-carboxaldhide, PEA (palmitoiletanolamida). La figura muestra el procedimiento que se llevó a cabo durante 21 días en el cual se expuso a los animales a alimento estándar, dieta de cafetería y agua *ad libitum*, administrando los tratamientos de manera intraperitoneal (IP) cada 24 h.

6.6.4 Análisis bioquímico

Al finalizar los experimentos se sacrificaron a las ratas como se menciona en la sección 6.3, los animales fueron sangrados directamente del ventrículo izquierdo del corazón, los sueros separados y alicuotados para el análisis bioquímico según

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

se describió en el apartado 6.5.4 del bloque I. En este experimento se midieron además los niveles séricos de insulina, colesterol y triglicéridos.

7. Resultados

7.1 Bloque I

7.1.1 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre la ganancia de peso de las ratas expuestas al modelo de atracón de alimentos

La figura 8 muestra el aumento de peso (expresado en porcentaje de cambio) en animales sometidos al protocolo de atracón de alimento y con los tres tratamientos farmacológicos: (i) vehículo (metanol 10%); (ii) 1 µmol/kg de 1-Boc-piperidina; y (iii) 10 µmol/kg de 1-Boc-piperidina. Además, un grupo control que sólo recibió alimentos y agua *ad libitum* también se consideró dentro del protocolo de este experimento. Encontramos diferencias significativas entre los tratamientos [$F_{(3, 120)} = 4.052$, $P = 0.009$] y semanas [$F_{(5, 120)} = 46.564$, $P < 0.001$], pero no en las interacciones [$F_{(15, 120)} = 0.504$, $P = 0.9324$]. Los animales incorporados en el protocolo de atracón (incluido el grupo que recibió vehículo) ganaron más peso que el grupo de control a lo largo del experimento (Figura 8A). En animales tratados con 1 µmol/kg de 1-Boc-piperidina y 10 µmol/kg de 1-Boc-piperidina se evitó el sobrepeso inducido por el protocolo de alimentación por atracones [$P>0.05$ vs grupo de control] (Figura 8B) por tanto, se puede observar que el tratamiento con 1-Boc-piperidina disminuyó el aumento de peso en las ratas expuestas al modelo de atracón.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

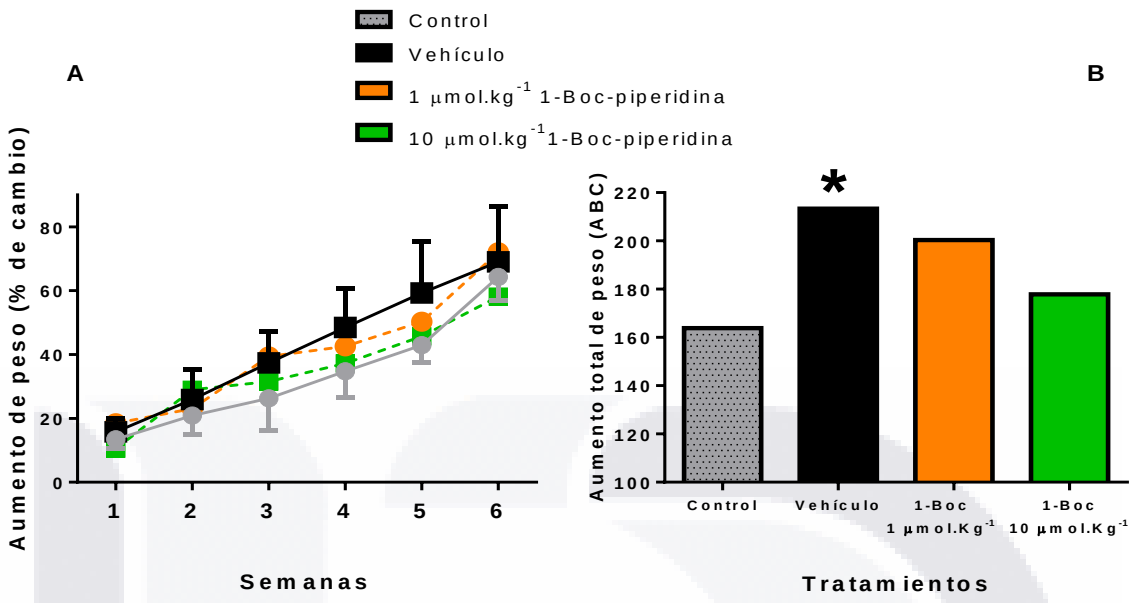


Figura 8. Efecto de 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído sobre el crecimiento del peso corporal en ratas hembra Wistar: (A) Curva de crecimiento del peso (cambio porcentual) con mediciones semanales; y (B) peso total de ganancia (área bajo la curva de A). *P<0.05 contra el grupo de control.

7.1.2 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre el comportamiento de atracón y en la preferencia del alimento hipercalórico en ratas

Con la finalidad de observar el comportamiento de atracón, así como la posible disminución en la preferencia por alimentos hipercalóricos, se evaluaron los efectos del 1-Boc-piperidina sobre la preferencia de alimentos hipercalóricos (i.e., galletas oreo), y consumo calórico por minuto (como se describe en los apartados 6.4 y 6.5.1).

La figura 9 muestra los efectos del vehículo o 1-Boc-piperidina en el protocolo de comportamiento de atracón. Se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos [$F_{(2, 75)} = 19.37$, $P < 0.001$] entre las semanas [$F_{(5, 75)} = 204.06$, $P < 0.001$], y la interacción (tratamientos/semanas) fue significativa [$F_{(10, 75)} = 5.45$, $P < 0.001$]. Los animales con 10 µmol/kg de 1-Boc-piperidina mostraron una

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

disminución en el perfil de consumo de galletas en comparación con el vehículo y 1 µmol/kg de 1-Boc-piperidina a partir de la semana 4. La Figura 9 también muestra un pico en el consumo de calorías en la semana 5, para mantenerse así el resto del experimento. El tratamiento con 1 µmol/kg de 1-Boc-piperidina redujo ligeramente la conducta de atracón (es decir, cantidad de calorías consumidas en una semana determinada), en comparación con el grupo Vehículo. Por otro lado, 10 µmol/kg de 1-Boc-piperidina redujeron aún más significativamente la conducta de atracón en comparación con el grupo Vehículo y 1 µmol/kg de 1-Boc-piperidina. Finalmente, en las semanas 5 y 6 se observó un comportamiento similar entre las dosis de 1 µmol/kg y 10 µmol/kg de 1-Boc-piperidina, difiriendo significativamente del Vehículo. Este resultado indica que ambas dosis de 1-Boc-piperidina redujeron la conducta compulsiva de la ingesta alimenticia y que este efecto fue más importante con la dosis mayor de 1-Boc-piperidina.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

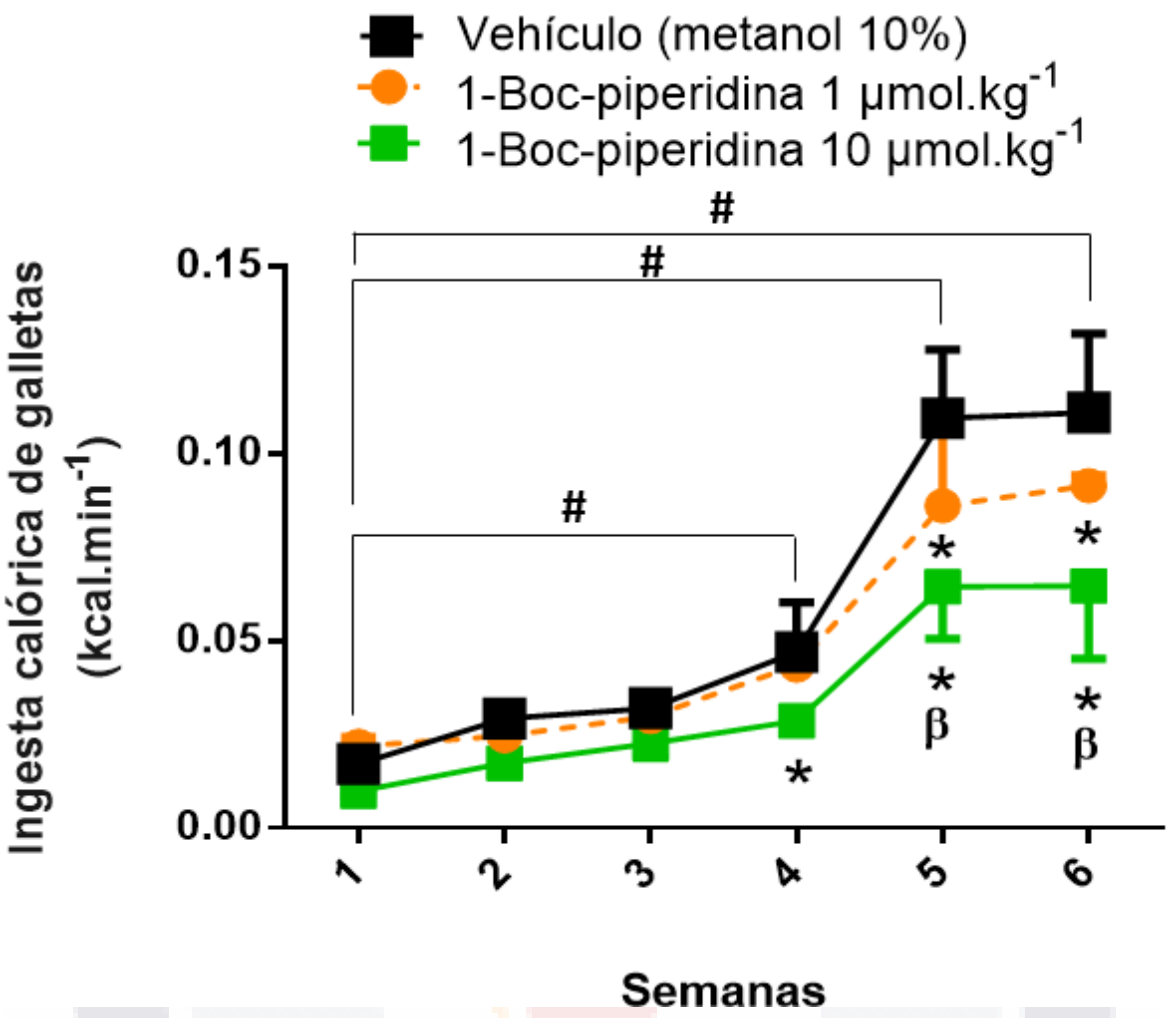


Figura 9. Efecto de 1-boc-piperidina-4-carboxaldehyde en el comportamiento de alimentación (kcal.min-1). Los animales tuvieron acceso a alimentos hipercalóricos (Oreo® galletas) durante 2 horas (semana 1 y 2), durante 1,5 horas (semana 3), durante 1,0 horas (semana 4) y 0,5 horas (semana 5 y 6). # P<0.05 contra semana, * P<0.05 contra el grupo de vehículo, β P<0.05 contra el grupo de 1 µmol/kg de 1-Boc-piperidina.

7.1.3 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre la conducta de ansiedad en ratas

Para la evaluación del efecto de 1-Boc-piperidina sobre la conducta de ansiedad, se utilizó el modelo Laberinto elevado en cruz.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La figura 10 muestra los efectos agudos de los tratamientos en comportamientos similares a la ansiedad en el paradigma del laberinto en cruz elevado. Hubo una diferencia significativa entre los tratamientos en el tiempo dedicado a brazos abiertos (Figura 10A). Los animales tratados con 1-Boc-piperidina (ambas dosis) mostraron una alta actividad exploratoria caracterizada por varios intervalos gastados predominantemente en brazos abiertos ($F_{(3, 20)} = 63.77$, $P < 0.001$). El grupo de vehículos mostró un ligero aumento en el tiempo invertido en brazos abiertos en comparación con el grupo de control (Figura 10A). La Figura 10B muestra el tiempo invertido en brazos cerrados, encontramos diferencias entre los grupos [$F_{(3, 20)} = 61.091$, $P < 0.001$] ya que ambos tratamientos con 1-Boc-piperidina mostraron una actividad exploratoria baja en brazos cerrados. El grupo de vehículo mostró una ligera disminución en el tiempo dedicado a los brazos cerrados en comparación con el grupo de control (Figura 10B). En cuanto al número de entradas, la figura 10C muestra las entradas en los brazos abiertos, encontramos una diferencia significativa entre los grupos [$F_{(3, 20)} = 9.556$, $P < 0.001$]. Ambas dosis (1 µmol/kg y 10 µmol/kg) de 1-Boc-piperidina aumentaron el número de entradas en los brazos abiertos en comparación con el grupo de control y el grupo vehículo. No hubo diferencias significativas entre los grupos en las entradas en los brazos cerrados [$F_{(3, 20)} = 2.73$, $P = 0.071$] (Figura 10D). Lo que nos indica que el efecto de 1-Boc-piperidina provocó un efecto ansiolítico posiblemente mediante GPR119.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

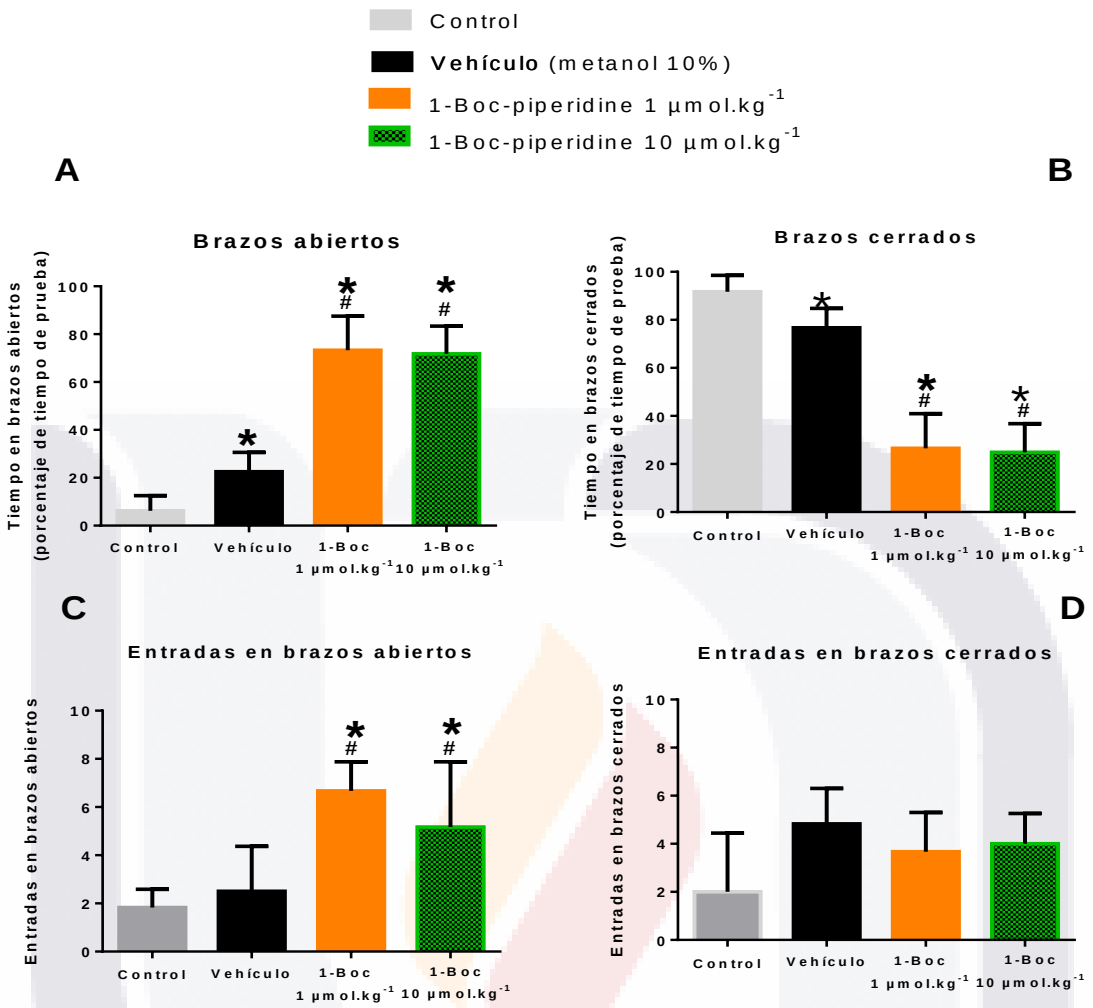


Figura 10. Laberinto en cruz elevado. Los resultados se muestran como la media ± SEM. (A) Tiempo invertido en los brazos abiertos; (B) Tiempo pasado en los brazos cerrados; (C) Número de entradas en los brazos abiertos y (D) Número de entradas en los brazos cerrados. *P < 0.05 vs. grupo control, #P < 0.05 vs. grupo de vehículo.

7.1.4 Efecto del 1-Boc-piperidina sobre la funcionalidad hepática

El estudio de las pruebas de funcionamiento hepático (glicemia, alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasas séricas), se realizó con la finalidad de evaluar el efecto hepatotóxico del 1-Boc-piperidina, y sobre el metabolismo de la glucosa.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La figura 11 muestra que en comparación con los grupos control intacto y el tratado con vehículo, la administración de 1 y 10 µmol de 1-Boc-piperidina no tuvieron efectos significativos sobre los niveles de glucosa (figura 11A) [$F_{(3,6)} = 1.564$, $P = 0.293$], aspartato amino transferasa (figura 11B) [$F_{(3,6)} = 0.0299$, $P = 0.992$] y alanina aminotransferasa (figura 11C) [$F_{(3,6)} = 0.0832$, $P = 0.967$] respectivamente. Estos resultados indican que ni la dieta, ni a las dosis administradas de 1-Boc-piperidina (1 y 10 µmol) poseen efectos tóxicos sobre el hígado, ni sobre el metabolismo de la glucosa.

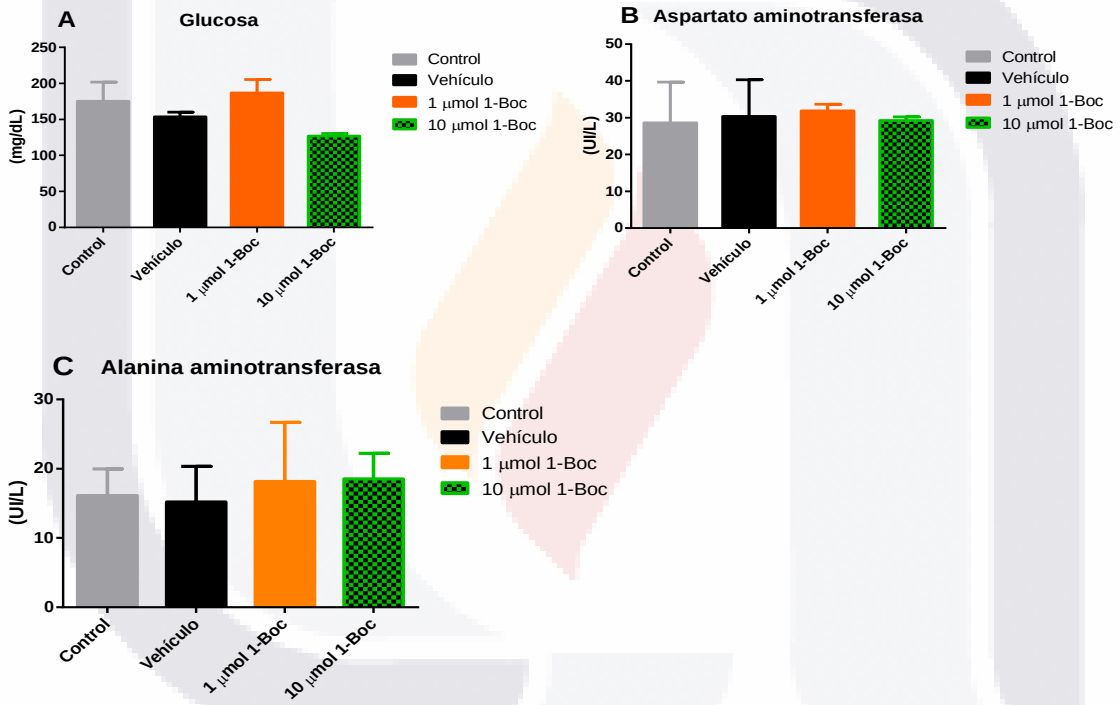


Figura 11. Pruebas de funcionamiento hepático en ratas sometidas adieta de atracón y tratadas con vehículo, 1 y 10 µmol/kg de 1-Boc-Piperidina. Un grupo Control intacto fue agregado para fines de comparación. P>0.05 (NS) entre los diferentes grupos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

7.2 Bloque II

7.2.1 Clasificación en ratas susceptibles y resistentes a la dieta de cafetería

En la figura 12A se muestra el incremento de peso corporal semanal expresado como porcentaje de cambio del peso inicial para seleccionar a las ratas susceptibles y no susceptibles (resistentes) a la dieta de cafetería. El incremento promedio del peso corporal a la primera semana fue de 19.97%. De los 32 animales sometidos a la prueba aquellas que presentaron un porcentaje de incremento menor al 19.97%, fueron consideradas como “resistentes” a la dieta (n=12). Por otro lado, las ratas cuyo incremento durante la semana 1 fue superior al valor de la media, fueron consideradas como susceptibles a la dieta de cafetería (n=20).

La figura12A muestra que el grupo de ratas susceptibles a la obesidad, incremento el peso corporal total (cambio porcentual) de manera significativa en relación con el grupo de ratas resistentes a la dieta [$F (1,112) = 81.231$, $P <0.001$]. En la figura 12B, se muestran las áreas bajo la curva de los cambios en el porcentaje de peso de los grupos resistentes y susceptibles a la dieta. Los resultados muestran un incremento significativo del peso corporal [$F (4,112) = 41.617$, $P <0.001$] (figura 12A). Estos resultados muestran que este método para determinar en un grupo homogéneo de ratas de la misma cepa puede ser usado para clasificar a las ratas como resistentes o susceptibles a desarrollar obesidad con la dieta de cafetería.

7.2.2 Efecto del 1-Boc-piperidina y la palmitoiletanolamida (PEA) sobre el peso corporal en ratas susceptibles a la obesidad expuestas a dieta de cafetería

En la figura 12C se comparan los efectos de tratar grupos de animales susceptibles a la dieta de cafetería con Vehículo (DMSO 5%+metanol al 1.3%), 1-Boc (2µmol), PEA (0.16 µmol) y Mix (PEA+1-BOC-piperidina) sobre el peso corporal semanal (expresado como porcentaje de cambio de peso/21 días). En comparación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con el grupo vehículo todos los grupos presentaron un menor porcentaje de incremento de peso corporal. Sin embargo, esta disminución fue solo significativa entre el grupo vehículo y los grupos tratados con 1-Boc-piperidina y PEA. [$F_{(2,40)}$ = 67.706, P <0.001] (figura 12C y 12D). Estos resultados indican que la PEA y el 1-Boc-Piperidina disminuyen el peso corporal de las ratas obesas por dieta de cafetería.

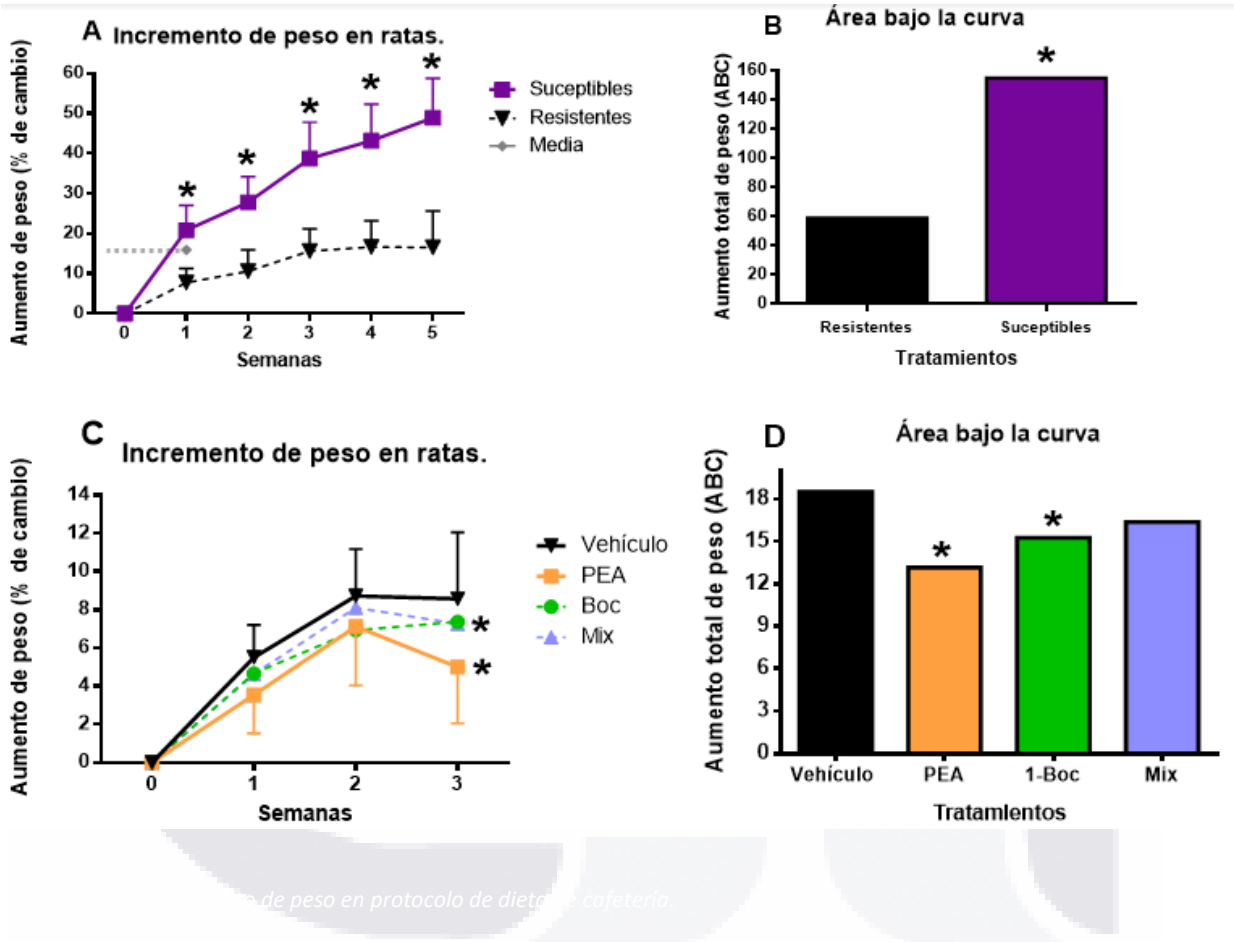


Figura 12. Cambio de peso semanal de ratas resistentes y susceptibles a la obesidad con dieta de cafetería y efecto de los tratamientos con 1-Boc-piperazina y palmitoiletanolamida (PEA) sobre el peso corporal de ratas susceptibles a dieta de cafetería. (A) muestra el incremento de peso y (B) el área bajo la curva de las ratas susceptible (n=20) y resistentes (n=12) a la dieta de cafetería durante 5 semanas. (C y D) muestra el efecto de los tratamientos: vehículo (DMSO 5%+metanol al 1.3%), 1-Boc (2µmol), PEA (0.16 µmol) y Mix (PEA+1-BOC-piperidina) sobre los cambios de peso corporal y el área bajo la curva (n=5 animales/grupo). *P<0.05 vs el grupo vehículo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

7.2.3 Efecto del 1-Boc-piperidina y la PEA sobre la preferencia de alimentos en la rata

La figura 13 muestra los efectos de los diferentes tratamientos sobre el consumo de calorías de ratas alimentadas con alimento estándar o dieta de cafetería. La figura 13A muestra que en comparación con el grupo vehículo no hubo diferencias significativas en el consumo de calorías entre los diferentes grupos en las semanas 1, sin embargo, en la segunda semana la comparación entre los grupos 1-Boc, Mix y Vehículo, mostro que el consumo de calorías fue significativamente menor en el grupo PEA [$F_{(3,48)} = 4.295$, $P = 0.015$] vs 1-Boc-piperidina, Mix y vehículo. En la semana 3, no se observaron diferencias significativas en el consumo calórico entre los diferentes grupos [$F_{(6,48)} = 1.227$, $P = 0.309$], sin embargo, la comparación entre la semana 3 contra las semanas 1 y 2 mostró diferencias significativas en el consumo calórico [$F_{(2,48)} = 8.278$, $P < 0.001$]. En la figura 13B se observa una diferencia significativa solo entre los grupos Mix y Vehículo [$F_{(3,48)} = 4.622$, $P = 0.011$]. Estos resultados muestran que la mezcla de PEA y 1-Boc tiene un efecto sinérgico en la disminución de la dieta estándar, sugiriendo un efecto anorexígeno significativo a partir de la tercera semana. La figura 13C muestra que la PEA induce una disminución significativa en el consumo calórico en comparación con los grupos Vehículo, 1-Boc y Mix [$F_{(3,60)} = 9.371$, $P < 0.001$]. La figura 13D muestra los efectos de los diferentes tratamientos sobre el consumo total de la dieta estándar. Observe que el tratamiento mixto de PEA y 1-Boc, indujo una disminución significativa en el consumo calórico, en comparación con los grupos Vehículo y PEA [$F_{(3,60)} = 3.738$, $P = 0.016$]. La figura 13 E muestra el consumo total de calorías de alimento estándar y de cafetería, se observó un claro descenso del consumo calórico total en el grupo PEA en comparación con los otros grupos, es decir, la administración de PEA redujo significativamente la ingesta calórica en el modelo de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

dieta de cafetería en comparación con los otros tratamientos [$F_{(3,60)} = 9.044$, $P < 0.001$].

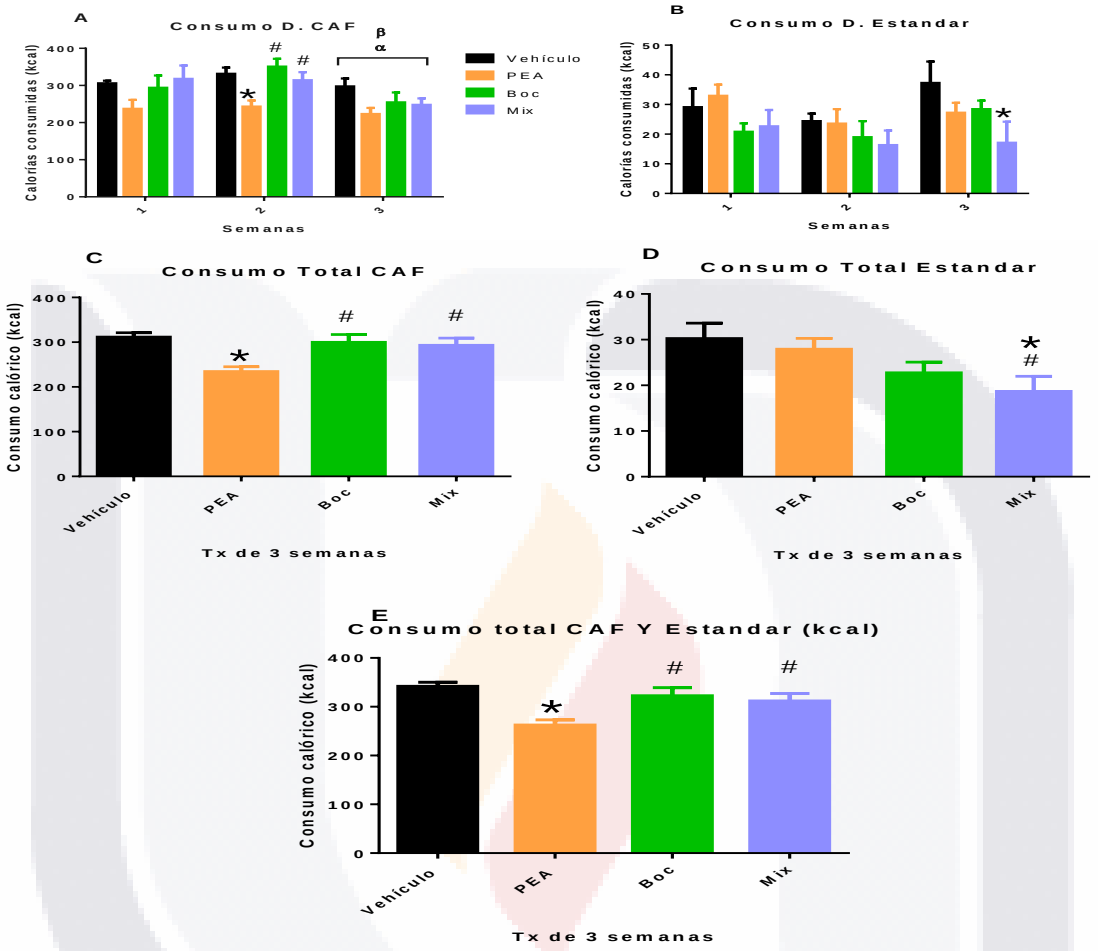


Figura 13. Consumo calórico semanal y total del alimento estándar y dieta de cafetería. Tratamiento en ratas durante 21 días, (A) muestra el consumo calórico de la dieta de cafetería durante tres semanas, B) muestra el consumo de la dieta estándar durante tres semanas, las C) y D) muestran el consumo total calórico ingerido de dieta de cafetería y dieta estándar respectivamente en el experimento y E) es la suma calórica de lo consumido en ambas dietas. *P< 0.05 contra el grupo de Vehículo, #P < 0.05 contra el grupo de PEA, βP< 0.05 contra la semana 1, αP< 0.05 contra la semana 2.

7.2.4 Efecto del 1-Boc-piperidina y la PEA sobre algunos parámetros bioquímicos en la sangre de ratas obesas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los análisis bioquímicos en el modelo de ‘dieta de cafetería’ se realizaron con el fin de comparar el efecto de 1-Boc-piperidina y PEA solos o en combinación, sobre el daño o protección metabólica en los animales mediante el estudio de los niveles totales de glucosa, insulina, colesterol y triglicéridos.

La figura 14 muestra los resultados de los ensayos bioquímicos realizados a las muestras obtenidas de ratas sometidas al experimento en el protocolo de dieta de cafetería (triglicéridos, colesterol, glucosa e insulina) n=20 cuatro por grupo. La figura A no reveló significancias entre los distintos tratamientos [$F_{(4,16)} = 0.561$, $P = 0.694$], sin embargo, los niveles de triglicéridos del grupo PEA se observan muy similares en comparación con los niveles del grupo control y por lo contrario disminuido en comparación con los otros tratamientos, sugiriendo mayor efecto con PEA en la reducción en los niveles de TG, la cual, si bien no mostró cambios significativos, sí es un indicador del efecto benéfico de este fármaco. La figura B muestra que el grupo PEA es el que se observa más similar en su media al control en comparación con los otros grupos, demostrando su efectividad en el control de niveles de colesterol, más no hubo cambios significativos vs vehículo ($P = 0.225$). Se mostró significancia estadística Mix vs Control [$F_{(4,16)} = 3.659$, $P = 0.027$] revelándose el grupo Mix con mayor nivel de colesterol que el control y el resto de los tratamientos. En la figura C se mostraron diferencias entre grupos Mix y 1-Boc-piperidina vs Control, Vehículo y PEA [$F_{(4,16)} = 9.605$, $P < 0.001$] donde los tratamientos de Mix y 1-Boc-piperidina mostraron niveles más bajos de glucosa en comparación con los otros grupos incluso que el grupo control. En cuanto a la figura D en donde se grafica el efecto de los fármacos sobre la insulina circulante, no hubo diferencias significativas [$F_{(4,10)} = 0.744$, $P = 0.583$], lo que indica que los tratamientos se mostraron homólogos en cuanto su acción sobre los niveles de insulina debido posiblemente a la administración crónica de éstos o a que la recolección de las muestras fue tomada mientras los animales se encontraban en ayuno. Lo que nos muestra que no hubo daño metabólico ocasionado por la dieta y/o por los tratamientos, adicionalmente se produjo una leve disminución en los niveles de glucosa en los grupos de 1-Boc-piperidina y Mix (dentro de los rangos normales), el análisis de la insulina no se mostró significativo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

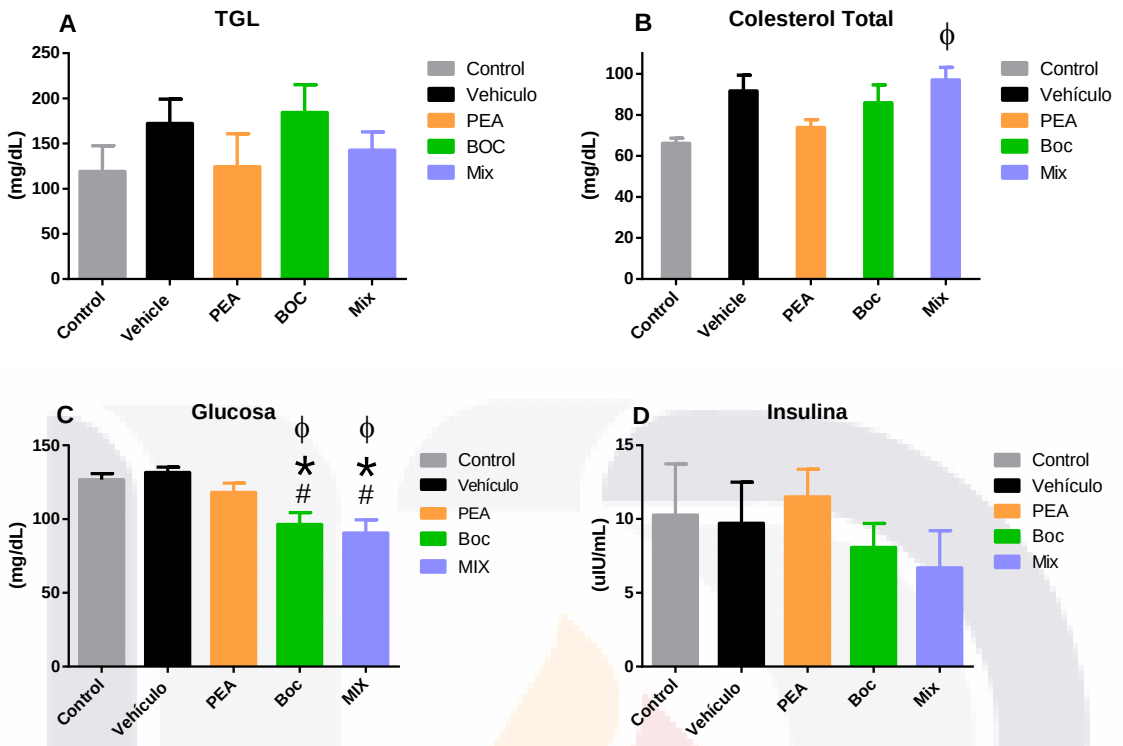


Figura 14. Análisis bioquímico del efecto del 1-Boc-piperidina, PEA y en combinación sobre el metabolismo. En la figura se observan los niveles circulantes en sangre de: A) triglicéridos, B) colesterol total, C) glucosa y D) niveles de insulina. ϕ P< 0.05 contra el grupo control, *P< 0.05 contra el grupo de Vehículo, #P < 0.05 contra el grupo de PEA.

7.3. Evaluación de los posibles mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina mediante la técnica de docking y modelado molecular

Debido a la falta de caracterización del 1-Boc-piperidina, y con el fin de estudiar su viabilidad para interactuar y actuar en GPR119 como agonista, se realizaron ensayos de modelado molecular y acoplamiento *in silico.*

Se seleccionó y validó la estructura del modelo GPR119 de rata por medio del servidor de modelo suizo (SWISS-MODEL) el cual es un base de datos en línea que proporciona plantillas comparativas para realizar el modelado molecular 3D utilizando el software ProMod3, el cual estima la configuración optima mediante el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

algoritmo TreePack basado en gráficos (Waterhouse et al., 2018). Se encontró que tiene sólo un residuo en la región no permitida de la parcela Ramachandran (Gln74, Figura 15) para GPR119, tres para 5-HT6 (Gly27, Arg91 y Trp92) y tres para 5-HT7 (Arg189, Phe240 y Ser362). No se identificaron otros datos estructurales utilizando todas las demás evaluaciones estructurales (HHpredB, NaiveBLAST, PRIMO, SPARKS-X, RaptorX, IntFOLD4-TS y Robetta) que respaldan la disposición natural de residuos en estos modelos 3D (no se muestra). Además, la afinidad estimada está relacionada con la reportada en las bases de datos IUPHAR o Pubchem para ligandos probados en nuestro modelo 3D, con un coeficiente de determinación que oscila entre 0.62 y 0.71 entre los valores de afinidad experimentales y estimados (Tabla 6). Los ligandos GPCRs ya reportados utilizados en este modelo para la comparación con el 1-Boc-piperidina se pueden observar en la tabla 6, donde la energía libre de Gibbs muestra la espontaneidad que tendrá una reacción (es decir si estará en equilibrio), si la energía libre se indica de forma negativa quiere decir que la reacción presentará algún desequilibrio o proceso exergónico, lo que implica la disminución de afinidad del ligando, situación que puede depender de la temperatura (Muras, Toulouse, Fritz, & Steuber, 2019). ‘‘En’’ o la entalpía y entropía (es decir la energía intercambiable del sistema con el medio) son magnitudes termodinámicas con los cuales se puede medir la energía libre de Gibbs y por lo tanto determinan la interacción del agonista y receptor (Chodera & Mobley, 2013; Klebe & Böhm, 1997). La última columna de la tabla 6 presenta el pKi o la constante de afinidad, es decir cuan menor sea el valor de éste, refleja una menor afinidad por el receptor, por lo cual entre mayor sea el pKi existe una mayor afinidad del ligando (tabla 6).

Tabla 6. Valores de pKi de ligandos probados mediante procedimiento de acoplamiento en GPCRs de rata probablemente involucrados. ª Valores relacionados con la afinidad experimental de la base de datos IUPHAR.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla No. 2. Valores de pKi calculados por modelado molecular para 1-Boc-piperidina o ligandos prototipo para los receptores GPR119, 5-HT6 y 5-HT7de rata.

Fármaco	Gibbs	En	pKi
En GPR119	r^2=0.71 (considerando AR231453 y MBX-2982 como valores atípicos)		
PSN 632408	-7.87	1.71E-06	5.8
1-Boc-piperidina	-7.64	1.35E-06	5.9
II-13-II-18-II-14	-8.09	1.18E-06	5.9
AR231453	-8.09	1.17E-06	5.9
II-13-II-18-II-18	-8.13	1.09E-06	6.0
APD-597	-8.38	7.26E-07	6.1
JNJ-38431055	-8.49	5.93E-07	6.2
BMS-903452	-8.56	5.32E-07	6.3
DS-8500a	-8.56	5.31E-07	6.3
APD-668	-8.65	4.60E-07	6.3
PSN-119-2	-9.19	1.94E-07	6.7
MBX-2982	-9.44	1.21E-07	6.9
YH18968	-9.55	1.00E-07	7.0
JTP-109192	-9.86	5.96E-08	7.2
GSK-1292263	-9.87	5.78E-08	7.2
En 5-HT6	r^2=0.66 (considerando WAY208466 un valor atípico)		
1-Boc-piperidina	-5.83	53.14E-06	4.3
EMD386088	-7.54	2.51E-06	5.6
WAY208466	-7.67	2.40E-06	5.6
SB271046	-9.17	190.92E-09	6.7
SB357134	-9.25	166.75E-09	6.8
SB399885	-9.26	164.26E-09	6.8
CERLAPIRIDINE	-9.50	108.51E-09	7.0
WAY181187	-9.59	93.83E-09	7.0
En 5-HT7	r^2=0.62 (considerado AS19 un valor atípico)		
1-Boc-piperidina	-5.79	57.31E-06	4.2
AS19	-7.57	2.63E-06	5.5
JNJ18038683	-8.98	2.82E-06	5.5
SB269970	-9.37	1.34E-06	5.7
DR4004	-10.53	18.99E-09	7.7
LP44	-10.70	14.26E-09	7.8
SB656104	-10.72	13.92E-09	7.9
LP211	-11.07	7.72E-09	8.1
LP12	-12.1	1.35E-09	8.9

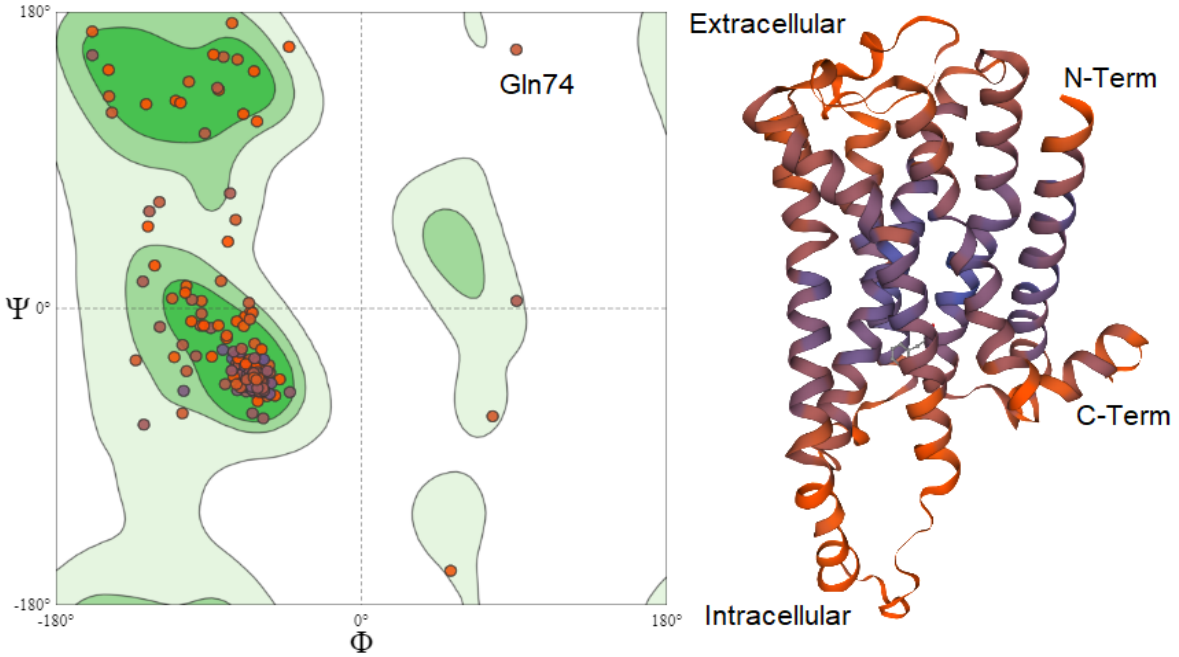
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

La posición de unión de ligandos en el complejo de mayor afinidad se encuentra frecuentemente en el lugar sugerido anteriormente como el sitio de unión ortostática para el receptor GPR119 (Figura 16), que interactúa con los residuos clave vinculados a la activación del receptor; pero en una posición menos profunda en el sitio ortostático para los receptores de serotonina. En el GPR119, las interacciones de 1-Boc-piperidina se detectaron principalmente con residuos del tercero al séptimo dominio transmembrana, y en su mayoría fueron Van Der Walls e interacciones hidrofóbicas, con la participación de los residuos Val85, Trp238, Phe241, Trp265 (Figura 16A-16B). Estas interacciones también se observaron utilizando otros compuestos selectivos bien conocidos (DS-8500a, JNJ-38431055 y Ser170), pero se encontraron interacciones adicionales, como puentes de hidrógeno, interacciones pi-pi y aquellas que involucran residuos del segundo al séptimo dominios transmembrana, así como algunos residuos del segundo bucle extracelular (Figura 16A, 16C y 16D). Las interacciones fueron limitadas en los residuos del tercer y quinto dominios transmembrana en los receptores de serotonina. Estos ensayos *in silico* sugirieron que 1-Boc-piperidina puede tener una afinidad baja-moderada con un pKi=5.9 para GPR119 (Tabla 6). Sin embargo, se estimó una menor afinidad en los receptores de serotonina, pKi=4.3 en 5-HT6 y pKi=4.2 en los receptores 5-HT7.

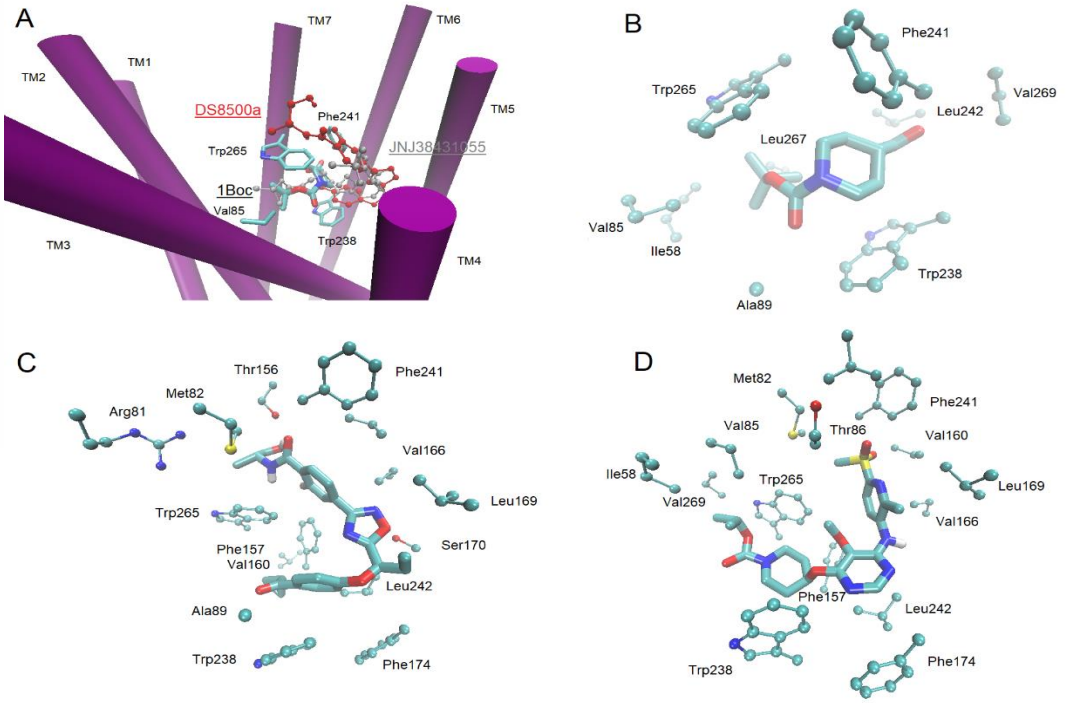
TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



No. 15. Modelado 3D del GPR1

Figura 15. El modelo 3D de GPR119. La trama de Ramachandran muestra sólo un residuo en la región no permitida, lo que sugiere poco impedimento estérico o afinidad por GPR119.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 16. Pose de acoplamiento de tres ligandos en GPR119. Los ligandos superpuestos en el sitio de unión, 1-Boc-piperidina, así como cuatro residuos conservados en las interacciones son como enlaces de regaliz, mientras que DS-8500a en bolas rojas y enlaces y JNJ38431055 en bolas grises y enlaces (A). Detalles de los residuos que interactúan para 1-Boc-piperidina (B), DS-8500a (C) y JNJ-38431055, Ser170 fue omitido para la exposición de ligando (D) en el GPR119 en el complejo teórico de mayor afinidad.

8. Discusiones

8.1 Discusión general

La presente investigación sugiere que el 1-Boc-piperidina puede generar efectos terapéuticos útiles tanto en la prevención como en el tratamiento de la obesidad. Otras piperidinas han sido reportadas con un amplio espectro de actividad biológica y una posible utilidad farmacológica contra la obesidad (Anet & Yavari, 1977; Narhe et al., 2017). Nuestras simulaciones computacionales sugieren que dentro de los posibles mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina es posible la participación del receptor huérfano GPR119. No obstante, otras investigaciones han reportado que las piperidinas pueden interactuar con otros receptores acoplados a la proteína G (GPCR) como lo son: colinérgicos (Takahama & Klee, 1990), cannabinoides (Amato, Manke, et al., 2019; Amato, Wiethe, et al., 2019), para GABA/glicina (Krogsgaard-Larsen, et al., 1980) y los receptores de serotonina (Brea et al., 2002). La mayoría de estos reportes sugieren que los efectos de las piperidinas suceden principalmente a nivel neuronal (Browning, Ethel, et al., 1990), aunque no se puede descartar categóricamente la participación de otros tejidos.

Dado que el 1-Boc-piperidina se utiliza como precursor de los agonistas selectivos de GPR119, los cuales se han patentado como posibles agentes anti-obesidad (PATENT CN201910382406.3A). Esto último, nos condujo a especular sobre la posible utilidad de esta molécula para prevenir el sobrepeso y la obesidad. Por lo tanto, evaluamos sus efetos sobre el comportamiento de atracón de alimentos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hipercalóricos y sobre la ingestión calórica de animales susceptibles a la obesidad por dieta de cafetería. Quisimos estudiar el posible mecanismo de acción del 1-Boc-piperidina, en particular, la participación potencial del receptor huérfano GPR119. Lamentablemente, ya que no existía comercialmente disponible un solo antagonista para el receptor GPR119 durante el desarrollo de este trabajo, realizamos una caracterización *in silico* de la capacidad hipotética de nuestra molécula para interactuar con GPR119 y otros receptores para los cuales el 1-Boc-piperidina es precursor (*i.e*., 5-HT6 y 5-HT7). Aunado a esto, estudios previos mostraron que ciertos fármacos derivados de piperidinas (por ejemplo, SB-649868) son antagonistas del receptor de orexina (Faedo et al., 2012), por lo cual es importante destacar que el sistema orexinérgico se encuentra involucrado en gran medida con la alimentación y otras funciones cognitivas (Tsujino & Sakurai, 2013). Por lo tanto, una perspectiva de este trabajo es la evaluación de los posibles efectos del 1-Boc-piperidina sobre el sistema orexigénico. Aun cuando los mecanismos de acción de las piperidinas no se encuentran plenamente establecidos, se han vinculado con efectos inhibidores de la actividad neuronal (Mishra, et al., 2015) y efectos ansiolíticos (Partyka, et al., 2018). Por tal motivo, decidimos analizar los efectos potenciales de 1-Boc-piperidina sobre la ansiedad. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que el 1-Boc-piperidina produce efectos ansiolíticos y efectos profilácticos y terapéuticos contra conductas obesogénicas como lo es el atracón de alimentos y contra la obesidad, respectivamente. Además, es posible que en estos efectos se incluya la participación del GPR119, mas no así del 5-HT6 y 5-HT7.

8.2 Posibles efectos profilácticos y seguridad hepática del 1-Boc-piperidina

Los resultados sugieren que dosis bajas de 1-Boc-piperidina (es decir, en el rango de micromoles por kilogramo) pueden evitar el aumento de peso inducido por el comportamiento de atracón al disminuir la preferencia en la ingestión del alimento hipercalórico (figuras 8 y 9). Estos resultados concuerdan con la hipótesis planteada y aunque el mecanismo de acción no ha podido ser identificado directamente en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

este trabajo, los efectos que encontramos son compatibles con una posible regulación energética y metabólica similar a la que podría inducir la activación de los GPR119 intestinales (Hansen et al., 2012; Li et al., 2018; Ramírez-Orozco et al., 2019; Zhu, et al., 2013). Los resultados son similares a otras investigaciones clínicas con el uso de ligandos para GPR119 (Payahoo et al., 2019) utilizando OEA en el control de la obesidad, (Mandøe et al., 2018) y comparando el 2-OG, el aceite de oliva y un aceite sintético C4, en humanos.

Adicionalmente, se analizaron los niveles de las enzimas hepáticas alanina y aspartato aminotransferasas (como indicadores de la funcionalidad hepática general), y así visualizar el posible daño metabólico causado por el fármaco y/o el comportamiento de atracón. Las transaminasas son un grupo de enzimas hepáticas que se encuentran dentro de la familia de las transferasas (por ejemplo, alanina y aspartato), que pueden ser alteradas por la estimulación de distintas hormonas como cortisol, aldosterona, tiroxina, entre otras, por lo que se ha reportado que altos niveles de estas enzimas pueden ser relacionados con padecimientos patológicos particularmente hepáticos (Mieli-Vergani et al., 2018; Sookoian & Pirola, 2015). Sin embargo, en esta investigación los niveles de estas enzimas fueron normales. Esto sugiere que no hubo alteraciones funcionales hepáticas por lo cual no hay sospecha alguna de daño hepático. Recientemente, se ha reportado que el APD668, un ligando del receptor GPR119 en uso concomitante con linagliptina el cual es un inhibidor de la Dipeptidil peptidasa-4 (DPP4), previene la escalada de la esteatohepatitis en ratones con dieta alta en grasa (Bahirat, Shenoy, Talwar, Goel, & Nemmani, 2018; Bahirat, Talwar, Shenoy, Nemmani, & Goel, 2019), sugiriendo la activación de este receptor como hepatoprotector al reducir la dislipidemia. Por otro lado, se debe admitir que aún no podemos demostrar que el mecanismo de acción del 1-Boc-piperidina implica a GPR119 ya que un antagonista selectivo aún no está disponible comercialmente.

Las personas con sobrepeso u obesidad experimentan frecuentes episodios de atracón de alimentos hipercalóricos (Roehrig, et al., 2009); los cuales se suelen relacionar con la ansiedad por la exposición al estrés social (Ostrovsky, et al., 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Es importante destacar que el estrés es capaz de promover el atracón en personas obesas y no obesas (Klatzkin, et al., 2018). Por lo anterior, el modelo utilizado en la presente tesis constituye una buena alternativa para entender los fenómenos que subyacen en los comportamientos obesogénicos inducidos por estrés, así como el potencial efecto terapéutico de fármacos que puedan regularla (*e.g.*, 1-Boc-piperidina).

Bajo nuestras condiciones experimentales, que incluían la exposición al estrés de manera aguda, el 1-Boc-piperidina redujo el comportamiento de atracón y produjo un efecto ansiolítico marcado en comparación con los grupos de control y vehículos (Figuras 9 y 10). Por lo tanto, la interpretación más simple de estos resultados podría ser que los efectos ansiolíticos inducidos por 1-Boc-piperidina pueden estar relacionados, al menos parcialmente, con sus efectos hipofágicos. La posibilidad anterior puede complementarse con la promoción de la saciedad inducida por GPR119 y el aspecto hedónico positivo obtenido, logrando una relación ansiolisis-hipofagia. Por lo que por un lado se podrían relacionar por ejemplo con el bloqueo del NPY ya que se ha reportado que su antagonismo y el de los receptores cannabinoides muestran efectos sinérgicos en la pérdida de masa corporal (Nguyen, Herzog, & Sainsbury, 2011) conduciendo a una regulación energética positiva y mientras la función de los receptores 5 y 4 están involucrados en respuestas de apetito el 2 está relacionado con la ansiedad (Chu, et al., 2007; Chu, et al., 2008; Fyfe, et al., 2008).

Por otro lado, los efectos ansiolíticos inducidos por 1-Boc-piperidina parecen ser similares a los reportados por otro derivado de la piperidina (PZ-1433) que indujo ansiolisis a través de receptores de serotonina 5-HT7 (Partyka, et al., 2018). Interesantemente, 1-Boc-piperidina también se utiliza para sintetizar compuestos que interactúan con los receptores de serotonina (por ejemplo, antagonistas selectivos de la serotonina 5-HT6 (Brea et al., 2002). Es importante destacar, que los receptores 5-HT6 y 5-HT7 de serotonina están involucrados en la ansiedad (Brea et al., 2002; Johnson, Ahmed, & Miller, 2008; Wicke, Haupt, & Bespalov, 2015). Sin embargo, nuestros resultados de docking desestiman la participación de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

receptores de serotonina 5-HT6 y 5-HT7 (Tabla 6) en los efectos del 1-Boc-piperidina. Por lo tanto, se requieren de más estudios para confirmar la farmacología de 1-Boc-piperidina y otras piperidinas. Por lo pronto, nuestros resultados constituyen una de las primeras evidencias que sugieren acciones ansiolíticas y anti-obesogénicas a dosis bajas de piperidinas.

8.3 Posibles efectos terapéuticos del 1-Boc-piperidina contra la obesidad

En la segunda parte de los experimentos, se evaluaron los agonistas 1-Boc y PEA, ligando no selectivo de GPR119, por separado y en combinación en un protocolo de dieta de cafetería conducido de manera crónica para evaluar su potencial terapéutico en GPR119, mediante una modalidad crónica c/24h/21días. En esta serie de experimentos, también se pudo observar un cambio en el comportamiento en cuanto a la preferencia del alimento hipercalórico, ocasionando una disminución del aumento gradual del peso corporal de las ratas, esto a partir del inicio con la administración de los tratamientos (figura 12), sin embargo, en esta ocasión el tratamiento con palmitoiletanolamida reveló una mayor acción en el comportamiento disminuyendo la ingesta del alimento chatarra en las ratas (muy posiblemente mediante el aumento de AMPc mediado por la activación de adenilato ciclasa) y además no causó cambios negativos en la preferencia del alimento estándar (figura 13), lo cual pudo haberse ocasionado por los efectos metabólicos que se le atribuyen a PEA (es decir: anorexígenos, control de la alimentación, memoria, cognitivos, etc.) al interactuar directa o indirectamente con receptores CB1, CB2, TRPV1, PPAR-α, GPR55 y / o GPR119 (Marichal, et al., 2016; Ramírez-Orozco et al., 2019), así como de sus posibles efectos ansiolíticos ya que PEA se ha mostrado como un posible antidepresivo (De Gregorio et al., 2019), lo que sugiere que 1-Boc-piperidina muestra mejores resultados en una modalidad aguda (figuras 8 y 9) y en administraciones preprandiales, lo que habla de la baja biodisponibilidad de la molécula en un tiempo prolongado, posiblemente mediante la acción de algún mecanismo ya mencionado.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

De esta manera se sugiere a PEA con mayor potencial terapéutico, disminuyendo el aumento progresivo de peso corporal, así como de la preferencia de la dieta de cafetería en una modalidad crónica, congruente con lo observado en (Ramírez-Orozco et al., 2019). Sin embargo, esto no desacredita los resultados obtenidos del 1-Boc-piperidina, al contrario, ofrece un poco más de luz a la falta de caracterización de la molécula, por lo cual el presente estudio debería motivar a más trabajos de investigación que permitan caracterizar mejor el perfil farmacológico de las piperidinas, debido al amplio espectro terapéutico que podrían ofrecer (Anet & Yavari, 1977). Además, el 1-Boc-piperidina arrojó menores niveles de glucosa e insulina, esto posiblemente debido a que la recolección de muestras se llevó a cabo 24 horas después de la última administración del tratamiento y en un estado de ayuno, lo que sería congruente en cuanto a lo esperado en la estimulación del GPR119 en el control de la glucemia postprandial como se ha propuesto en otros trabajos (Hansen et al., 2012; Zhu et al., 2013), así mismo los niveles de glucosa mostraron resultados muy similares en comparación con otra investigación, dónde (Li et al., 2018) se sugiere que en estado de ayuno al estimular GPR119 se induce mayor efecto en células alfa que en células beta pancreáticas logrando así una contra regulación metabólica durante el ayuno.

Por otro lado, en cuanto a colesterol y triglicéridos, PEA mostró mayor actividad al presentar menores niveles de estos lípidos, lo que es congruente con trabajos anteriores donde PEA y otros ligandos sintetizados a base de fosfolípidos de membrana regulan los niveles lipídicos (Pieralice et al., 2019; Stensson et al., 2018), sugiriendo un mayor efecto de éste en comparación con 1-Boc-piperidina al disminuir riesgos de dislipidemia en un modelo crónico.

Por tales motivos se debe incitar a mayor investigación sobre ligandos putativos GPR119 para su uso farmacológico en las comorbilidades de la obesidad, ya sea solas o en combinación con otros fármacos, gracias a sus posibles beneficios terapéuticos que podrían proporcionar en conductas y alteraciones asociadas a la obesidad (Miyata et al., 1980; Takahama & Klee, 1990).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

8.4 Caracterización preliminar de los mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina

Debido a la falta de una caracterización sobre el mecanismo de acción del 1-Boc-piperidina, se realizó una prueba *in silico* para observar el grado de afinidad del ligando al GPR119. Hasta donde sabemos, no hay informes sobre la afinidad teórica o experimental de 1-Boc-piperidina en los receptores GPR119, sin embargo, nuestros estudios de simulación *in silico* sugirieron que 1-Boc-piperidina puede tener una afinidad baja-moderada por GPR119 (pKi=5.9) y una baja afinidad por los receptores de serotonina 5-HT6 y 5-HT7 (pKi=4.3 y 4.2 respectivamente) (Tabla 6). Además, el farmacóforo de compuestos recientemente reportados con alta selectividad, potencia y eficacia para GPR119 incluye un grupo arilo, hetero arilo, pero a menudo pirimidina o piperidina (Neelamkavil et al., 2018; Zhou, Wang, Zhang, Tang, & Feng, 2019). La postura de unión 1-Boc-piperidina comparte claramente el sitio de unión de compuestos con acción bien conocida en este receptor, y la energía de unión estimada es ligeramente más débil (pKi=5.87) que la estimada para los ligandos considerados como agentes selectivos y potentes (con un rango de 5.92 a 7.24). Además, de acuerdo con los resultados de nuestras simulaciones de acoplamiento, 1-Boc-piperidina puede interactuar con los residuos a través de una acción clave en el reconocimiento del ligando y la actividad funcional de GPR119, sugerida por los ensayos mutacionales reportados. Así, puede interactuar con un residuo de Val85 en el tercer dominio aparentemente relacionado con la actividad basal y la eficacia de los ligandos en el receptor objetivo, y también interactúa con un residuo Phe241, que cuando es cambiado por Ala a través de una mutación disminuye la expresión GPR119 en la membrana y su actividad basal. En este sentido, el 1-Boc-piperidina interactúa a través de pi-pi e interacciones hidrofóbicas en un sitio limitado en un extremo por Trp238 y Trp265, un par de residuos ubicados en el sexto y séptimo dominios transmembranas respectivamente, del GPR119. Estos residuos están claramente relacionados con la potencia de los ligandos en GPR119, ya que su mutación por Ala disminuyó drásticamente la potencia de los ligandos (Norn et al., 2015).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Por lo tanto, podemos sugerir preliminarmente que algunos de los efectos inducidos por 1-Boc-piperidina pueden involucrar receptores GPR119, sin embargo, tanto el sitio de unión en los complejos de mayor energía como la afinidad estimada sugieren un efecto más débil e insignificante sobre los receptores de serotonina 5-HT6 y 5-HT7. Además, como ya se mencionó, los agonistas GPR119 fueron patentados como fármacos anti-obesidad (PATENT CN201910382406.3A), un hecho que coincide con nuestros resultados en conjunto con los ya reportados apoya la hipótesis de que los receptores GPR119 están involucrados en los efectos inhibitorios de 1-Boc-piperidina en el comportamiento de atracón. Al menos un ensayo clínico sugiere efectos biológicos similares en humanos inducidos por la acción agonista del 2-oleil glicerol en GPR119 (Hansen, et al., 2011).

8.5 “Consideraciones finales y perspectivas”

Claramente se necesitan más experimentos para analizar tanto los mecanismos de acción como los efectos agudos y crónicos inducidos por 1-Boc-piperidina. Si bien es cierto que nuestros ensayos *in silico* sugieren un efecto insignificante de 1-Boc-piperidina en los receptores de serotonina (Tabla 6). Sin embargo, ya que estos estudios preliminares no son concluyentes, la posible participación de los receptores de serotonina en los mecanismos de acción de 1-Boc-piperidina no puede descartarse categóricamente.

Como nuestros ensayos *in silico* sugieren que 1-Boc-piperidina puede interactuar como un agonista débil-moderado de GPR119, es posible que el efecto anoréxico de este compuesto haya sido a través de promover la saciedad. En apoyo de esta sugerencia, se ha descrito que la estimulación de GPR119 induce hipofagia a través de vías dependientes de la insulina (Chu, et al., 2007; Chu, et al., 2008; Fyfe, et al., 2008). Claramente, se han propuesto otras piperidinas para modular los receptores colinérgicos (Takahama & Klee, 1990), cannbinérgicos (Amato, Manke, et al., 2019; Amato, Wiethe, et al., 2019), GABAérgicos y glicinérgicos (Krogsgaard-Larsen, et al., 1980). Por otra parte, otro derivado de piperidina como el SB-649868,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fue reportado como un antagonista para el receptor de orexina (Faedo et al., 2012), que ha sido involucrado en la alimentación y otras funciones cognitivas (Tsujino & Sakurai, 2013). Por lo tanto, el mecanismo de acción de 1-Boc-piperidina para producir efectos ansiolíticos y la inhibición del comportamiento de atracón continúan siendo investigados. Sin embargo, y hasta donde sabemos, los presentes resultados sugieren una acción terapéutica potencial de dosis bajas de piperidinas contra el sobrepeso y la ansiedad y creemos que estos hallazgos deben son los suficientemente sugerentes para motivar más investigaciones en este campo del conocimiento.

9. Conclusión

En su conjunto, nuestros resultados sugieren que 1-Boc-piperidina puede ser una molécula útil para prevenir el atracón de alimentos y tratar la obesidad inducida por la dieta de cafetería. Dichos efectos protectores parecen involucrar efectos ansiolíticos a través de mecanismos que requieren ser estudiados más profundamente.

Aunque los mecanismos de acción del 1-Boc-piperidina para prevenir el sobrepeso requieren ser corroborados, nuestro análisis *in silico* sugiere una posible participación del receptor huérfano GPR119, pero no de los receptores 5HT-6 y 5HT-7.

10. Glosario

- 1-Boc-piperidina: 1-Boc-piperidina-4-carboxaldehído; presunto agonista de GPR119.
- 1-OG: 1-oleoil-glicerol; fosfolípido de membrana agonista endocannabinoide.
- 2-AG: 2-araquidonilglicerol agonista endógeno de receptores CB1 y CB2.
- 2-OG: 2-oleoilglicerol agonista endógeno de GPR119.
- 5-HT6: receptor de serotoninérgico.
- 5-HT7: receptor de serotoninérgico.
- AACE: Organización Estadounidense de Endocrinólogos Clínicos.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- AEA: araquidonil etanolamida o anandamida endocannabinoide de CB1 y CB2.
- AGAH: enzima ácido graso amido hidrolasa.
- AgRP: polipéptido relacionado con la proteína agouti.
- AHA: American Heart Association *por sus siglas en inglés*.
- AMPc: adenosín monofosfato cíclico.
- ANOVA: análisis de varianza para comparar múltiples medias.
- ARC: núcleo arqueado del hipotálamo.
- ATP: adenosín trifosfato.
- ATPIII: Adult Treatment Panel III *por sus siglas en inglés*.
- CART: transcriptor regulado por cocaína y anfetamina.
- CB1, CB2: receptores cannabinoides 1 y 2.
- CPF: corteza prefrontal.
- CRH: Hormona liberadora de corticotropina.
- DMT2: diabetes mellitus tipo 2.
- DPP4: dipeptidil peptidasa 4; enzima que hidroliza al GLP-1.
- ECV: enfermedad cerebro vascular.
- EGIR: Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina.
- EHGNA: enfermedad de hígado graso no alcohólico o esteatosis hepática.
- EPM: paradigma del laberinto en cruz elevado.
- FDA: food and drug administration.
- GABA: ácido γ-aminobutírico; neurotransmisor inhibidor principal del SNC.
- GH: hormona del crecimiento.
- GHS-R: receptor secretagogo de la hormona del crecimiento.
- GIP: péptido insulinotrópico dependiente de glucosa o péptido inhibidor gástrico.
- GLP-1: péptido similar al glucagón – 1, hormona intestinal.
- GLUT4: proteína transportadora de glucosa – 4 al interior de la célula, regulada por insulina.
- GPCRs: familia de receptores acoplados a una proteína G.
- GPR119: receptor acoplado a una proteína G 119.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- HDL: lipoproteínas de alta densidad *por sus siglas en inglés*.
- HL: hipotálamo lateral.
- HPA: eje hipotalámico-hipofisiario -adrenal.
- HSL: lipasa sensible a las hormonas.
- IDF: Fundación internacional de diabetes.
- IMC: índice de masa corporal.
- *In silico*: pruebas de simulaciones o repeticiones en computadora.
- INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- RI: resistencia a la insulina.
- IUPHAR: Unión internacional de farmacología *por sus siglas en inglés*.
- JAK-STAT: sistema de vías de señalización involucrado en procesos como apoptosis, mitosis, etc.
- LDL: lipoproteínas de baja densidad (*por sus siglas en ingles)*.
- LHA: núcleo lateral del hipotálamo.
- MAGL: enzima monoacilglicerol lipasa.
- MC3,4: receptores de melanocortina 3 y 4.
- MSH: hormona α-melanocítica.
- NAc: núcleo accumbens.
- NAFLD: enfermedad de hígado graso no alcohólico (*por sus siglas en inglés*).
- NIH: Instituto nacional de salud (*por sus siglas en inglés)*.
- NPY: neuro péptido Y.
- NTS: núcleo del tracto solitario.
- ObRb: receptor de leptina.
- OEA: oleoil etanolamina.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PA: perímetro abdominal.
- PBS: buffer de fosfatos.
- PEA: palmitoil etanolamina.
- POMC: sistema propiomelanocortina precursor de hormonas y proteínas.
- PPARα: Receptores activados por proliferadores peroxisomales.
- PVN: núcleo ventricular hipotalámico.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- PYY: péptido YY relacionado con efectos anorexinérgicos.
- RCC: relación cintura cadera.
- SEC: sistema endocannabinoide.
- SEM: error estándar de la media.
- SM: síndrome metabólico.
- SNC: sistema nervioso central.
- SNP: sistema nervioso periférico.
- TG: triglicéridos.
- THC: tetrahidrocannabinol.
- TNFα: factor necrótico tumoral α.
- TRPV1: receptor de potencial transitorio vaniloide tipo 1 *por sus siglas en inglés*.
- TSH: hormona estimulante de la tiroides.
- VMH: núcleo hipotalámico ventromedial.
- VTA: área tegmental ventral.
- WAT: tejido adiposo blanco *por sus siglas en inglés*.

11. Perspectivas

Dentro de mis perspectivas puedo decir me gustaría seguir con un doctorado en investigación en la UAA en el mismo laboratorio que me encuentro, y de ésta manera continuar con la experimentación de: 1) Realizar estudios histológicos para corroborar el posible daño hepático causado por el 1-Boc-piperidina o algún otro ligando de GPR119, 2) Realizar análisis de glucosa e insulina en un modelo agudo (atracón de alimentos) y así corroborar si realmente el 1-Boc-piperidina estimula la liberación de insulina mediante la activación del GPR119 y 3) Realizar un modelado *in silico* del receptor 5HT6 serotoninérgico y observar la posible afinidad del 1-Boc-piperidina. Durante el proceso una de mis ambiciones es contar con un buen número de publicaciones al momento de llegar al posdoctoral.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

12. Referencias

Abdel-Magid, A. F. (2019, January). Treatment of Diabetes, Obesity, Dyslipidemia, and Related Disorders with GPR119 Agonists. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 10, pp. 14–15. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00622

Adam, T. C., & Epel, E. S. (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior*, *91*(4), 449–458. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.011

Alboni, S., Micioni Di Bonaventura, M. V., Benatti, C., Giusepponi, M. E., Brunello, N., & Cifani, C. (2017). Hypothalamic expression of inflammatory mediators in an animal model of binge eating. *Behavioural Brain Research*, *320*, 420–430. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.044

Amato, G., Manke, A., Wiethe, R., Vasukuttan, V., Snyder, R., Yueh, Y. L., … Maitra, R. (2019). Functionalized 6-(Piperidin-1-yl)-8,9-Diphenyl Purines as Peripherally Restricted Inverse Agonists of the CB1 Receptor [Research-article]. *Journal of Medicinal Chemistry*, *62*(13), 6330–6345. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00727

Amato, G., Wiethe, R., Manke, A., Vasukuttan, V., Snyder, R., Runyon, S., & Maitra, R. (2019). Functionalized 6-(piperidin-1-yl)-8,9-diphenyl purines as inverse agonists of the CB1 receptor – SAR efforts towards selectivity and peripheralization. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *27*(16), 3632–3649. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.002

Anet, F. A. L., & Yavari, I. (1977). Nitrogen inversion in N-chloropiperdine. *Tetrahedron Letters*, *18*(37), 3207–3210. https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)83198-1

Artukoglu, B. B., Beyer, C., Zuloff-Shani, A., Brener, E., & Bloch, M. H. (2017). Efficacy of Palmitoylethanolamide for Pain: A Meta-Analysis. *Pain Physician*, *20*(5), 353–362.

Bahirat, U. A., Shenoy, R. R., Talwar, R., Goel, R. N., & Nemmani, K. V. S. (2018). Co-administration of APD668, a G protein-coupled receptor 119 agonist and linagliptin, a DPPIV inhibitor, prevents progression of steatohepatitis in mice fed on a high trans-fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *495*(2), 1608–1613. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.004

Bahirat, U. A., Talwar, R., Shenoy, R. R., Nemmani, K. V. S., & Goel, R. N. (2019). Combination of APD668, a G protein-coupled receptor 119 agonist with linagliptin, a DPPIV inhibitor, prevents progression of steatohepatitis in a murine model of non-alcoholic steatohepatitis with diabetes. *Medical Molecular Morphology*, *52*(1), 36–43. https://doi.org/10.1007/s00795-018-0200-4

Bayne, K. (1996). Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *The Physiologist*, *39*(4), 199,208-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

211.

Bermudez-Silva, F. J., Viveros, M. P., McPartland, J. M., & Rodriguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *95*(4), 375–382. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2010.03.012

Bernardis, L. L., Davis, P. J., & McEwen, G. (1986). Differential effect of common snack foods on caloric intake, growth and obesity in weanling male and female rats with hypothalamic obesity. *Appetite*, *7*(4), 387–398. https://doi.org/10.1016/s0195-6663(86)80007-1

Brea, J., Rodrigo, J., Carrieri, A., Sanz, F., Cadavid, M. I., Enguix, M. J., … Loza, M. I. (2002). New serotonin 5-HT2A, 5-HT2B, and 5-HT2C receptor antagonists: Synthesis, pharmacology, 3D-QSAR, and molecular modeling of (aminoalkyl)benzo and heterocycloalkanones. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(1), 54–71. https://doi.org/10.1021/jm011014y

Browning, Ethel, et al., 1990. (1990). *olutionary aspects. The various chap- ter\ 1111'*. *2*, 450. https://doi.org/doi.org/10.1002/jat.2550100519 PDFPDF

Brutman, J. N., Sirohi, S., & Davis, J. F. (2019). Examining the Impact of Estrogen on Binge Feeding, Food-Motivated Behavior, and Body Weight in Female Rats. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *27*(10), 1617–1626. https://doi.org/10.1002/oby.22582

Buqué, et al. 2008. (2008). Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, *100*(9), 565–578. https://doi.org/10.4321/s1130-01082008000900007

Calabrese, E. J., & Rubio-Casillas, A. (2018). Biphasic effects of THC in memory and cognition. *European Journal of Clinical Investigation*, *48*(5), e12920. https://doi.org/10.1111/eci.12920

Carrasco, et al., 2013. (2013). Síndrome de resistencia a la insulina. estudio y manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *24*(5), 827–837. https://doi.org/10.1016/s0716-8640(13)70230-x

Casarrubea, M., Roy, V., Sorbera, F., Magnusson, M. S., Santangelo, A., Arabo, A., & Crescimanno, G. (2013). Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test. *Behavioural Brain Research*, *237*, 290–299. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.09.049

Castro, et al., 2012. (2012). *Esteatosis Mexico 19*. (55), 128–132. Retrieved from https://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2012/cc122e.pdf

Chen, Q.-B., Gao, J., Zou, G.-A., Xin, X.-L., & Aisa, H. A. (2018). Piperidine Alkaloids with Diverse Skeletons from Anacyclus pyrethrum. *Journal of Natural Products*, *81*(6), 1474–1482. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00239

Chodera, J. D., & Mobley, D. L. (2013). Entropy-enthalpy compensation: role and ramifications in biomolecular ligand recognition and design. *Annual Review of*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Biophysics, *42*, 121–142. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130318

Chu, et al., 2007. (2007). A role for β-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology*, *148*(6), 2601–2609. https://doi.org/10.1210/en.2006-1608

Chu, et al., 2008. (2008). A role for intestinal endocrine cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide release. *Endocrinology*, *149*(5), 2038–2047. https://doi.org/10.1210/en.2007-0966

Cvijanovic, N., Isaacs, N. J., Rayner, C. K., Feinle-Bisset, C., Young, R. L., & Little, T. J. (2017). Lipid stimulation of fatty acid sensors in the human duodenum: Relationship with gastrointestinal hormones, BMI and diet. *International Journal of Obesity*, *41*(2), 233–239. https://doi.org/10.1038/ijo.2016.199

De Gregorio, D., Manchia, M., Carpiniello, B., Valtorta, F., Nobile, M., Gobbi, G., & Comai, S. (2019). Role of palmitoylethanolamide (PEA) in depression: Translational evidence: Special Section on “Translational and Neuroscience Studies in Affective Disorders”. Section Editor, Maria Nobile MD, PhD. This Section of JAD focuses on the relevance of translatio. *Journal of Affective Disorders*, *255*(July), 195–200. https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.10.117

Dimaraki, E. V, & Jaffe, C. A. (2006). Role of endogenous ghrelin in growth hormone secretion, appetite regulation and metabolism. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *7*(4), 237–249. https://doi.org/10.1007/s11154-006-9022-0

Doucette, W. T., Khokhar, J. Y., & Green, A. I. (2015). Nucleus accumbens deep brain stimulation in a rat model of binge eating. *Translational Psychiatry*, *5*(12), e695. https://doi.org/10.1038/tp.2015.197

Faedo, S., Perdonà, E., Antolini, M., Di Fabio, R., Merlo Pich, E., & Corsi, M. (2012). Functional and binding kinetic studies make a distinction between OX 1 and OX2 orexin receptor antagonists. *European Journal of Pharmacology*, *692*(1–3), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.07.007

Fan, et al., 2019. (2019). Triglycerides to high-density lipoprotein cholesterol ratio as a surrogate for nonalcoholic fatty liver disease: A cross-sectional study. *Lipids in Health and Disease*, *18*(1), 1–6. https://doi.org/10.1186/s12944-019-0986-7

Figee, M., Pattij, T., Willuhn, I., Luigjes, J., van den Brink, W., Goudriaan, A., … Denys, D. (2016). Compulsivity in obsessive-compulsive disorder and addictions. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *26*(5), 856–868. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.12.003

Franjo Grotenhermen. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids*, *1*(1), 10–14.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Fujioka, K. (2002). Management of Obesity as a Chronic Disease: Nonpharmacologic, Pharmacologic, and Surgical Options. *Obesity Research*. https://doi.org/10.1038/oby.2002.204

Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., … Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, *114*(12), 1752–1761. https://doi.org/10.1172/JCI21625

Fyfe, et al., 2008. (2008). GPR119 agonists as potential new oral agents for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *3*(4), 403–413. https://doi.org/10.1517/17460441.3.4.403

Gabrielsson, L., Mattsson, S., & Fowler, C. J. (2016). Palmitoylethanolamide for the treatment of pain: pharmacokinetics, safety and efficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *82*(4), 932–942. https://doi.org/10.1111/bcp.13020

Gadde, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H.-R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. *Journal of the American College of Cardiology*, *71*(1), 69–84. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011

Giménez Palop, O., & Caixàs, A. (2009). Péptido YY: una nueva estrategia para el tratamiento de la obesidad. *Endocrinología y Nutrición*, *56*(1), 1–3. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1575-0922(09)70186-X

Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A., & Kunos, G. (2009a). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, *89*(3–4), 105–111. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001

Godlewski, G., Offertáler, L., Wagner, J. A., & Kunos, G. (2009b, September). Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, Vol. 89, pp. 105–111. https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2009.07.001

González-Jiménez, E., & Schmidt Río-Valle, J. (2012). Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutricion Hospitalaria*, *27*(6), 1850–1859. https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6099

Goyena, R., & Fallis, A. . (2019). Obesidad. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9), 1689–1699. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Guerrero-Alba, R., Barragán-Iglesias, P., González-Hernández, A., Valdez-Moráles, E. E., Granados-Soto, V., Condés-Lara, M., … Marichal-Cancino, B. A. (2019). Some Prospective Alternatives for Treating Pain: The Endocannabinoid System and Its Putative Receptors GPR18 and GPR55. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 1496. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01496

Guzmán, M., & Galve-Roperh, I. (2009). Endocannabinoides : un nuevo sistema de comunicación en el cerebro. *Avances en neurociencia : neurotransmisores y*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

patologías nerviosas.

Hall, K. D., & Guo, J. (2017). Obesity Energetics: Body Weight Regulation and the Effects of Diet Composition. *Gastroenterology*, *152*(7), 1718-1727.e3. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.052

Halpern, C. H., Wolf, J. A., Bale, T. L., Stunkard, A. J., Danish, S. F., Grossman, M., … Baltuch, G. H. (2008). Deep brain stimulation in the treatment of obesity. *Journal of Neurosurgery*, *109*(4), 625–634. https://doi.org/10.3171/JNS/2008/109/10/0625

Hansen, et al., 2011. (2011). *2-Oleoyl Glycerol Is a GPR119 Agonist and Signals GLP-1 Release in Humans*. *96*(September), 1409–1417. https://doi.org/10.1210/jc.2011-0647

Hansen, H. S., Rosenkilde, M. M., Holst, J. J., & Schwartz, T. W. (2012, July). GPR119 as a fat sensor. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 33, pp. 374–381. https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.014

Hernández Ruiz de Eguilaz, M., Martínez de Morentin Aldabe, B., Almiron-Roig, E., Pérez-Diez, S., San Cristóbal Blanco, R., Navas-Carretero, S., & Martínez, J. A. (2018). Influencia multisensorial sobre la conducta alimentaria: ingesta hedónica. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, *65*(2), 114–125. https://doi.org/10.1016/j.endinu.2017.09.008

Humphrey, William., Dalke, Andrew., Schulten, K. (1996). *Visual Molecular Dynamics.Pdf*. Retrieved from https://www.csb.pitt.edu/BBSI/2007/lectures/VMD.pdf

Janas-Kozik, et al., 2006. (2006). [Ghrelin--The guardian of energy balance]. *Psychiatria polska*, *40*(1), 119–128.

Jayasinghe, T. N., Chiavaroli, V., Holland, D. J., Cutfield, W. S., & O'Sullivan, J. M. (2016). The New Era of Treatment for Obesity and Metabolic Disorders: Evidence and Expectations for Gut Microbiome Transplantation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *6*, 15. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00015

Johnson, C. N., Ahmed, M., & Miller, N. D. (2008). 5-HT6 receptor antagonists: prospects for the treatment of cognitive disorders including dementia. *Curr. Opin. Drug Discovery Devel.*, *11*, 642.

Joshi, N., & Onaivi, E. S. (2019). *Endocannabinoid System Components: Overview and Tissue Distribution*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_1

Kasé, Y., & Miyata, T. (1976). Neurobiology of piperidine: its relevance to CNS function. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, *15*, 5–16.

Kells, M., & Kelly-Weeder, S. (2019). Binge eating behavior among a cohort of normal weight college women. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners*, *31*(12), 741–746. https://doi.org/10.1097/JXX.0000000000000317

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Klatzkin, et al., 2018. (2018). Stress-induced eating in women with binge-eating disorder and obesity. *Biological Psychology*, *131*, 96–106. https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2016.11.002

Klebe, G., & Böhm, H. J. (1997). Energetic and entropic factors determining binding affinity in protein-ligand complexes. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, *17*(1–3), 459–473. https://doi.org/10.3109/10799899709036621

Krogsgaard-Larsen, et al., 1980. (1980). *Piperidine-4-sulphonic Acid, a New Specific GABA Agonist*. *34*(3), 756–759.

Lafuente, M. D. (2011). Tratamiento Cognitivo Conductual De La Obesidad Cognitive Behavioural Therapy for Obesity. *Trastornos de La Conducta Alimentaria*, *14*, 1490–1504. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2869.2010.00868.x

Lahsen, 2014. (2014). Sindrome metabólico y diabetes. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *25*(1), 47–52. https://doi.org/10.1016/s0716-8640(14)70010-0

Lee, et al., 2018. (2018). Association of non-alcoholic steatohepatitis with subclinical myocardial dysfunction in non-cirrhotic patients. *Journal of Hepatology*, *68*(4), 764–772. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.11.023

Li, N. X., Brown, S., Kowalski, T., Wu, M., Yang, L., Dai, G., … Kelley, D. E. (2018). GPR119 agonism increases glucagon secretion during insulin-induced hypoglycemia. *Diabetes*, *67*(7), 1401–1413. https://doi.org/10.2337/db18-0031

López-Jaramillo, P., Barbosa, E., Molina, D. I., Sanchez, R., Diaz, M., Camacho, P. A., … Zanchetti, A. (2019). Latin American Consensus on the management of hypertension in the patient with diabetes and the metabolic syndrome. *Journal of Hypertension*, *37*(6), 1126–1147. https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002072

Lozano, M., & González, A. (2010). Actualización en obesidad. *Cadernos de Atención Primaria, ISSN 1134-3583, Vol. 17, Nº. 2, 2010, Pags. 101-107*.

Mandøe, M. J., Hansen, K. B., Windeløv, J. A., Knop, F. K., Rehfeld, J. F., Rosenkilde, M. M., … Hansen, H. S. (2018). Comparing olive oil and C4-dietary oil, a prodrug for the GPR119 agonist, 2-oleoyl glycerol, less energy intake of the latter is needed to stimulate incretin hormone secretion in overweight subjects with type 2 diabetes. *Nutrition & Diabetes*, *8*(1), 2. https://doi.org/10.1038/s41387-017-0011-z

Manwell, L. A., Miladinovic, T., Raaphorst, E., Rana, S., Malecki, S., & Mallet, P. E. (2019). Chronic nicotine exposure attenuates the effects of Δ(9) -tetrahydrocannabinol on anxiety-related behavior and social interaction in adult male and female rats. *Brain and Behavior*, *9*(11), e01375. https://doi.org/10.1002/brb3.1375

Marichal, et al., 2016. (2016). Advances in the Physiology of GPR55 in the Central

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Nervous System. *Current Neuropharmacology*, *15*(5), 771–778. https://doi.org/10.2174/1570159x14666160729155441

Mathiew-Quirós, A., Salinas-Martínez, A. M., Hernández-Herrera, R. J., & Gallardo-Vela, J. A. (2014). Metabolic syndrome in workers of a second level hospital. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *52*(5), 580–587.

McGrath, J. C., Drummond, G. B., McLachlan, E. M., Kilkenny, C., & Wainwright, C. L. (2010, August). Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*, Vol. 160, pp. 1573–1576. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00873.x

Mieli-Vergani, G., Vergani, D., Czaja, A. J., Manns, M. P., Krawitt, E. L., Vierling, J. M., … Montano-Loza, A. J. (2018). Autoimmune hepatitis. *Nature Reviews. Disease Primers*, *4*, 18017. https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.17

Mishra, et al., 2015. (2015). Anticonvulsant mechanisms of piperine, a piperidine alkaloid. *Channels*, *9*(5), 317–323. https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1092836

Miyata, T., Okano, Y., Fukunaga, K., Takahama, K., & Kasé, Y. (1980). Seasonal and activity-dependent variations of piperidine levels in the amphibian brain. *Brain Research*, *197*(1), 279–284. https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90460-6

Moral, A. R., Çankayalı, İ., Sergin, D., & Boyacılar, Ö. (2015). Neuromuscular Functions on Experimental Acute Methanol Intoxication. *Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation*, *43*(5), 337–343. https://doi.org/10.5152/TJAR.2015.13471

Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16), 2785–2791. https://doi.org/10.1002/jcc.21256

Moss, C. E., Glass, L. L., Diakogiannaki, E., Pais, R., Lenaghan, C., Smith, D. M., … Reimann, F. (2016). Lipid derivatives activate GPR119 and trigger GLP-1 secretion in primary murine L-cells. *Peptides*, *77*, 16–20. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.06.012

Munoz Tedo, C., R. Carlson, N., & Munoz Tedo, C. (2005). *Fisiologia de la conducta (8a. ed.)*. Retrieved from https://elibro.net/es/lc/uaa/titulos/85158

Muras, V., Toulouse, C., Fritz, G., & Steuber, J. (2019). Respiratory Membrane Protein Complexes Convert Chemical Energy. *Sub-Cellular Biochemistry*, *92*, 301–335. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_10

Narhe, B. D., Breman, A. C., Padwal, J., Vandenput, D. A. L., Scheidt, J. M., Benningshof, J. C. J., … Filippov, D. V. (2017). Piperidine and octahydropyrano[3,4-c] pyridine scaffolds for drug-like molecular libraries of the European Lead Factory. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *25*(19), 5160–5170.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.016

Neelamkavil, S. F., Stamford, A. W., Kowalski, T., Biswas, D., Boyle, C., Chackalamannil, S., … Greenlee, W. J. (2018). Discovery of MK-8282 as a Potent G-Protein-Coupled Receptor 119 Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, *9*(5), 457–461. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00073

Nguyen, A. D., Herzog, H., & Sainsbury, A. (2011). Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, *18*(1), 56–60. https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283422f0a

Norn, C., Hauge, M., Engelstoft, M. S., Kim, S. H., Lehmann, J., Jones, R. M., … Frimurer, T. M. (2015). Mutation-Guided Unbiased Modeling of the Fat Sensor GPR119 for High-Yield Agonist Screening. *Structure (London, England : 1993)*, *23*(12), 2377–2386. https://doi.org/10.1016/j.str.2015.09.014

Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. (2017). Obesity Update 2017. *Diabetologe*, *13*(5), 331–341. Retrieved from www.oecd.org/health/obesity-update.htm

Ostrovsky, et al., 2013. (2013). Social anxiety and disordered overeating: An association among overweight and obese individuals. *Eating Behaviors*, *14*(2), 145–148. https://doi.org/10.1016/j.eatbeh.2013.01.009

Overton, H. A., Fyfe, M. C. T., & Reynet, C. (2008). GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *British Journal of Pharmacology*, *153*(SUPPL. 1), 76–81. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707529

Palomer, X., Pérez, A., & Blanco-Vaca, F. (2005). Adiponectina: Un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Medicina Clinica*, *124*(10), 388–395. https://doi.org/10.1157/13072576

Park, Y. H., Choi, H. H., Lee, D. H., Chung, S. Y., Yang, N. Y., Kim, D. H., … Kim, K.-W. (2017). YH18421, a novel GPR119 agonist exerts sustained glucose lowering and weight loss in diabetic mouse model. *Archives of Pharmacal Research*, *40*(6), 772–782. https://doi.org/10.1007/s12272-017-0925-y

Partyka, et al., 2018. (2018). *ANXIOLYTIC-LIKE ACTIVITY OF PZ-1433 , A NOVEL ARYLSULFONAMIDE DERIVATIVE OF ARYLOXY (PROPYL) PIPERIDINE , IN RODENTS*. *28*(110), 35–46. Retrieved from http://psjd.icm.edu.pl/psjd/element/bwmeta1.element.psjd-7751f567-971c-4778-921c-f4cf39a5b6fd

Payahoo, L., Khajebishak, Y., Alivand, M. R., Soleimanzade, H., Alipour, S., Barzegari, A., & Ostadrahimi, A. (2019). Investigation the effect of oleoylethanolamide supplementation on the abundance of Akkermansia muciniphila bacterium and the dietary intakes in people with obesity: A randomized clinical trial. *Appetite*, *141*, 104301.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.05.032

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, *14*(3), 149–167. https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7

Petrosino, S., & Di Marzo, V. (2017). The pharmacology of palmitoylethanolamide and first data on the therapeutic efficacy of some of its new formulations. *British Journal of Pharmacology*, *174*(11), 1349–1365. https://doi.org/10.1111/bph.13580

Pieralice, S., Vari, R., Minutolo, A., Maurizi, A. R., Fioriti, E., Napoli, N., … Maddaloni, E. (2019). Biomarkers of response to alpha-lipoic acid ± palmitoiletanolamide treatment in patients with diabetes and symptoms of peripheral neuropathy. *Endocrine*, *66*(2), 178–184. https://doi.org/10.1007/s12020-019-01917-w

Pineda, C. A. (2008). Síndrome metabólico: Definición, historia, criterios. *Colombia Medica*, *39*(1), 96–106.

Ramírez-Orozco, R. E., García-Ruiz, R., Morales, P., Villalón, C. M., Villafán-Bernal, J. R., & Marichal-Cancino, B. A. (2019). Potential metabolic and behavioural roles of the putative endocannabinoid receptors GPR18, GPR55 and GPR119 in feeding. *Current Neuropharmacology*, *17*(10), 947–960. https://doi.org/10.2174/1570159x17666190118143014

Ray, P., Torck, A., Quigley, L., Wangzhou, A., Neiman, M., Rao, C., … Price, T. J. (2018). Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. *Pain*, *159*(7), 1325–1345. https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001217

Richey, J. M., & Woolcott, O. (2017, October 1). Re-visiting the Endocannabinoid System and Its Therapeutic Potential in Obesity and Associated Diseases. *Current Diabetes Reports*, Vol. 17. https://doi.org/10.1007/s11892-017-0924-x

Ricote, A. I. R. (2016). Universidad Complutense De Madrid Facultad De Farmacia Trabajo Fin De Grado _____ Fisiopatología De La Obesidad. *Fisiopatología De La Obesidad*, 1–20. Retrieved from http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANA ISABEL RINCON RICOTE.pdf

Röe, O. (1982). Species differences in methanol poisoning. *Critical Reviews in Toxicology*, *10*(4), 275–286. https://doi.org/10.3109/10408448209003368

Roehrig, et al., 2009. (2009). Dieting frequency in obese patients with binge eating disorder: Behavioral and metabolic correlates. *Obesity*, *17*(4), 689–697. https://doi.org/10.1038/oby.2008.600

Sagae, et al., 2013. (2013). Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

rats fed with cafeteria diet. *Physiology & Behavior*, *119*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.029

Sagae, et al., 2015. (2015). [Blockade of AT1 receptor of Angiotensin II reduces the number of antral follicles in female rats with obesity induced by cafeteria diet]. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*, *37*(7), 302–307. https://doi.org/10.1590/S0100-720320150005352

Servin, C. (2013). Nutrición básica y aplicada. *Universidad Nacional Autónoma De México*, 276. Retrieved from http://www.eneo.unam.mx/publicaciones/publicaciones/ENEO-UNAM-NutricionBasicayAplicada.pdf

Simpson, K. A., Martin, N. M., & Bloom, S. R. (2008). Hypothalamic regulation of appetite. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, *3*(5), 577–592. https://doi.org/10.1586/17446651.3.5.577

Sookoian, S., & Pirola, C. J. (2015, January). Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *World Journal of Gastroenterology*, Vol. 21, pp. 711–725. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i3.711

Soto González, A., & López-Villalta Lozano, M. J. (2010). Actualización en obesidad. *Cadernos de Atención Primaria*, *17*, 101–107. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/47757523

Stensson, N., Ghafouri, N., Ernberg, M., Mannerkorpi, K., Kosek, E., Gerdle, B., & Ghafouri, B. (2018). The Relationship of Endocannabinoidome Lipid Mediators With Pain and Psychological Stress in Women With Fibromyalgia: A Case-Control Study. *The Journal of Pain : Official Journal of the American Pain Society*, *19*(11), 1318–1328. https://doi.org/10.1016/j.jpain.2018.05.008

Syed, S. K., Bui, H. H., Beavers, L. S., Farb, T. B., Ficorilli, J., Chesterfield, A. K., … Efanov, A. M. (2012). Regulation of GPR119 receptor activity with endocannabinoid-like lipids. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *303*(12), E1469-78. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00269.2012

Tadaki, H., Sasase, T., Fukuda, S., Toriniwa, Y., Harada, K., Ohta, T., & Yamada, T. (2019). Chronic treatment of JTP-109192, a novel G-protein coupled receptor 119 agonist, improves metabolic abnormalities in Zucker Fatty rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *46*(10), 910–919. https://doi.org/10.1111/1440-1681.13152

Takahama, K., & Klee, M. R. (1990). Piperidine discriminates between the transient and the persistent components of the ACh-induced chloride current in Aplysia neurons. *Brain Research*, *508*(1), 161–164. https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91131-y

Terrazas-Romero, M. E., Flores-Boyso, G. J., Zenil-Magaña, N. T., Landa-Ramírez,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

E., & Reséndiz-Barragán, A. M. (2018). [Estrategias de afrontamiento para el manejo del estrés y su relación con el nivel de obesidad y calidad de vida en pacientes candidatos a cirugía bariátrica]. *Gaceta medica de Mexico*, *154*(5), 569–574. https://doi.org/10.24875/GMM.18004175

Tomic, et al., 2018. (2018). Nonalcoholic fatty liver disease: Current concepts, epidemiology and management strategies. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *30*(10), 1103–1115. https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001235

Tomlinson, W. J., & Newnham, M. (1984). Corrosion pitting of nitrided surface coatings. *Surface Technology*, *23*(4), 387–390. https://doi.org/10.1016/0376-4583(84)90008-6

Tsujino, N., & Sakurai, T. (2013). Role of orexin in modulating arousal, feeding and motivation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*(MAR), 1–14. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00028

Turton, R., Chami, R., & Treasure, J. (2017). Emotional Eating, Binge Eating and Animal Models of Binge-Type Eating Disorders. *Current Obesity Reports*, *6*(2), 217–228. https://doi.org/10.1007/s13679-017-0265-8

Tyurenkov, I. N., Kurkin, D. V., Bakulin, D. A., Volotova, E. V., Morkovin, E. I., Chafeev, M. A., & Karapetian, R. N. (2018). Chemistry and hypoglycemic activity of GPR119 agonist ZB-16. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(SEP). https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00543

Valenzuela Avendaño, C., & Cruz, G. (2014). SISTEMA ENDOCANABINOIDE Y TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD: PERSPECTIVAS FARMACOLÓGICAS (Endocannabinoid system and obesity: Pharmacological perspectives). *Revista de Farmacologia de Chile*, *7*.

Valle, U., César, J., Valle, U., Sánchez, J. C., Sc, M., & Ph, D. (2005). *Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28336109*.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., … Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. https://doi.org/10.1093/nar/gky427

Wicke, K., Haupt, A., & Bespalov, A. (2015). Investigational drugs targeting 5-HT6 receptors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin. Invest. Drugs*, *24*, 1515.

Yang, J. W., Kim, H. S., Choi, Y.-W., Kim, Y.-M., & Kang, K. W. (2018). Therapeutic application of GPR119 ligands in metabolic disorders. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *20*(2), 257–269. https://doi.org/10.1111/dom.13062

Yazgan, Ü. C., Elbey, B., Kuş, S., Baykal, B., Keskin, I., Yılmaz, A., & Şahin, A. (2017). Effect of caffeic acid phenethyl ester on oxidant and anti-oxidant status of liver and serum in a rat model with acute methanol intoxication. *Irish Journal*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

of Medical Science, *186*(2), 519–523. https://doi.org/10.1007/s11845-016-1462-2

Zajdel, P., Marciniec, K., Satała, G., Canale, V., Kos, T., Partyka, A., … Millan, M. J. (2016). 5-HT6 receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol. Med.*, *10*(6), 590. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00056

Zamith-Miranda, D., Fox, E. G. P., Monteiro, A. P., Gama, D., Poublan, L. E., de Araujo, A. F., … Diaz, B. L. (2018). The allergic response mediated by fire ant venom proteins. *Scientific Reports*, *8*(1), 14427. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32327-z

Zhou, Y., Wang, Y., Zhang, L., Tang, C., & Feng, B. (2019). Discovery and biological evaluation of novel G protein-coupled receptor 119 agonists for type 2 diabetes. *Archiv Der Pharmazie*, *352*(4), e1800267. https://doi.org/10.1002/ardp.201800267

Zhu, et al., 2013. (2013). GPR119 Agonists: A Novel Strategy for Type 2 Diabetes Treatment. In *Diabetes Mellitus - Insights and Perspectives*. https://doi.org/10.5772/48444

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS