



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

**“EVALUACIÓN NEUROQUÍMICA DEL ROL DEL SEPTUM LATERAL EN UN MODELO DE
EXPOSICIÓN CRÓNICA A DIETA ALTA EN GRASA EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY”**

VICTORIA CAROLINA COLLIO SOTO

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Director de Tesis:
PROF. DR. RAMÓN SOTOMAYOR ZÁRATE**
Universidad de Valparaíso

**Co-Directora de Tesis:
PROF. DRA. GEORGINA M. RENARD**
Universidad de Santiago de Chile

2022

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis ha sido llevado a cabo gracias al financiamiento de la Beca Nacional de Magíster CONICYT del año 2018, al Proyecto FONDECYT Regular N° 120-0474 otorgado al Dr. Ramón Sotomayor-Zárate y al Proyecto DIUV-CI N° 01-2006 otorgado al Centro de Neurobiología y Fisiopatología Integrativa. Además, agradezco a las dependencias del Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso por el apoyo otorgado a la realización de esta tesis de magíster.

INDICE

1.	RESUMEN	5
2.	ABSTRACT	7
3.	INTRODUCCIÓN.....	9
3.1	AREAS CEREBRALES ASOCIADAS AL CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN	10
3.1.1	HIPOTÁLAMO Y CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN	10
3.1.2	SEPTUM LATERAL E INGESTA DE ALIMENTOS	11
3.2	CONTROL HOMEOSTÁTICO DE LA INGESTA ALIMENTARIA.....	11
3.3	CONTROL HEDÓNICO DE LA ALIMENTACIÓN.....	12
3.4	INTERACCIÓN DEL CONTROL HOMEOSTÁTICO Y HEDÓNICO DE LA ALIMENTACIÓN.....	13
3.5	ROL DE SEPTUM LATERAL EN EL CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN	14
4.	HIPÓTESIS.....	18
5.	OBJETIVOS.....	18
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	18
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
7.1	REACTIVOS	20
7.2	ANIMALES	20
7.3	DIETA	20
7.4	REGISTRO DE PESO.....	21
7.5	TEST PREFERENCIA DE SACAROSA	21
7.6	EUTANASIA DE ANIMALES Y MICRODISECCIÓN	21
7.7	MEDICIÓN CONTENIDO TISULAR DE NEUROTRANSMISORES.....	22
7.7.1	DETERMINACIÓN DE DA Y 5-HT POR HPLC-EC.....	22
7.7.2	DETERMINACIÓN DE GLU Y GABA POR HPLC-FLUOROMÉTRICO	22
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
9.	RESULTADOS.....	25
9.1	CARACTERIZACIÓN DE MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR HFD.....	25
9.2	ESTUDIO CONDUCTUAL DE PREFERENCIA POR SOLUCIÓN DE SACAROSA.....	26
9.3	MEDICIÓN DE CONTENIDO TISULAR DE NEUROTRANSMISORES	28
9.3.1	CONTENIDO DE DA EN NUCLEO ACCUMBENS Y SEPTUM LATERAL.....	28

9.3.2	CONTENIDO DE GABA EN NUCLEO ACCUMBENS, SEPTUM LATERAL, HIPOTALAMO LATERAL Y ESTRIADO DORSAL.....	29
9.3.3	CONTENIDO DE GLU EN NUCLEO ACCUMBENS, SEPTUM LATERAL, HIPOTALAMO LATERAL Y ESTRIADO DORSAL.....	30
9.3.4	CONTENIDO DE 5-HT EN NUCLEO ACCUMBENS Y SEPTUM LATERAL	31
10.	DISCUSION.....	32
10.1	EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A HFD EN LA PREFERENCIA DE SACAROSA EN ANIMALES DE AMBOS SEXOS.	32
10.2	EFFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE DA EN NAcc Y SL.	33
10.3	EFFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE GABA EN NAcc, SL, HL Y DLS.....	33
10.4	EFFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE GLU EN NAcc, SL, HL Y DLS.	34
10.5	EFFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE 5-HT EN NAcc Y SL..	34
11.	CONCLUSIONES.....	36
12.	BIBLIOGRAFÍA	38

1. RESUMEN

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un aumento del tejido adiposo que lleva al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como diabetes, hipertensión y dislipidemias, entre otras. En la obesidad, el control homeostático y hedónico de la alimentación se encuentran alterados y son los responsables de mantener la conducta de hiperfagia. En este contexto, el septum lateral (SL) es un área cerebral que regula a través de proyecciones GABAérgicas ambos sistemas reguladores de la ingesta de alimentos, inhibiendo el hipotálamo lateral (HL) y activando el área tegmental ventral (VTA). Sin embargo, los efectos de la exposición crónica a una dieta alta en grasas (HFD) sobre la neuroquímica de SL y su rol en la manutención de la condición de obesidad ha sido poco estudiado.

El objetivo de fue evaluar los cambios neuroquímicos en neurotransmisores de áreas cerebrales asociadas al control de la ingesta de alimentos en un modelo de obesidad inducida por dieta en ratas Sprague-Dawley, expuestas a una prueba de preferencia al consumo de sacarosa.

Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la preferencia por la sacarosa en todos los grupos experimentales. Sin embargo, en ratas macho HFD hubo un significativo aumento en ingesta de la solución de sacarosa al 10% respecto del control, indicando una preferencia por la solución con mayor valor recompensante. Por otro lado, en las ratas hembras la exposición a HFD produjo un menor consumo de la solución de sacarosa al 10% respecto al grupo control, indicando posiblemente alteraciones en los circuitos neuroquímicos asociados a conductas recompensantes.

A nivel neuroquímico, la exposición a HFD por 6 semanas produjo principalmente una disminución de los niveles de dopamina (DA) en LS de ratas machos, sin afectar el contenido de este neurotransmisor en hembras. En núcleo accumbens (NAcc), un área cerebral por excelencia asociada a la recompensa, solo se observó diferencias sexuales donde machos de ambos grupos experimentales y tuvieron más contenido de DA que sus respectivos grupos experimentales de hembras. En relación a neurotransmisores aminoacídrgicos como GABA solo observamos una reducción significativa del contenido septal de GABA en hembras expuestas a HFD respecto hembras control, sin observarse cambios en machos en ninguno de los otros núcleos estudiados. Respecto a Glutamato (GLU) solo observamos una diferencia sexual en hipotálamo lateral (HL) entre los grupos control, que se pierde entre los grupos expuestos a HFD. Finalmente, el contenido de 5-HT demostró que machos y hembras expuestas a HFD tienen un aumento significativo en el contenido septal de 5-HT en comparación a sus

respectivos grupos control. Mientras que el NAcc, solo observamos una disminución del contenido en machos HFD respecto machos control.

La investigación realizada en esta tesis entrega información relevante sobre los efectos neurobiológicos de estímulos deletéreos como la HFD en etapas tempranas del desarrollo y que pueden predisponer a condiciones patológicas tan relevantes como la obesidad. Experimentos nuevos serán necesarios para dilucidar de mejor manera los efectos de cerebrales funcionales de la HFD en este modelo animal de obesidad infanto juvenil.

Palabras Claves: HFD, dopamina, serotonina, glutamato, GABA, machos, hembras y septum lateral.

2. ABSTRACT

Obesity is a chronic disease characterized by an increase in adipose tissue that leads to the development of chronic non-communicable diseases such as diabetes, hypertension and dyslipidemia, among others. In obesity, homeostatic and hedonic control of feeding are altered and are responsible for maintaining hyperphagia behavior. In this context, the lateral septum (SL) is a brain area that regulates both food intake regulatory systems through GABAergic projections, inhibiting the lateral hypothalamus (HL) and activating the ventral tegmental area (VTA). However, the effects of chronic exposure to a high-fat diet (HFD) on the neurochemistry of SL and its role in maintaining obesity has been poorly studied.

The objective of was to evaluate the neurochemical changes in neurotransmitters of brain areas associated with the control of food intake in a model of obesity induced by diet in Sprague-Dawley rats, exposed to a sucrose consumption preference test.

The results obtained showed an increase in the preference for sucrose in all the experimental groups. However, in male HFD rats there was a significant increase in intake of the 10% sucrose solution compared to the control, indicating a preference for the solution with the highest reward value. On the other hand, in female rats, exposure to HFD produced a lower consumption of 10% sucrose solution compared to the control group, possibly indicating alterations in the neurochemical circuits associated with rewarding behaviors.

At the neurochemical level, exposure to HFD for 6 weeks mainly produced a decrease in dopamine (DA) levels in the LS of male rats, without affecting the content of this neurotransmitter in females. In the nucleus accumbens (NAcc), a brain area par excellence associated with reward, sexual differences were only observed where males from both experimental groups had more DA content than their respective experimental groups of females. In relation to aminoacidergic neurotransmitters such as GABA, we only observed a significant reduction in the septal content of GABA in females exposed to HFD compared to control females, without observing changes in males in any of the other nuclei studied. Regarding Glutamate (GLU), we only observed a sexual difference in the lateral hypothalamus (HL) between the control groups, which was lost between the groups exposed to HFD. Finally, 5-HT content showed that HFD-exposed males and females have a significant increase in septal 5-HT content compared to their respective control groups. While in the NAcc, we only observed a decrease in the content in HFD males compared to control males.

The research carried out in this thesis provides relevant information on the neurobiological effects of deleterious stimuli such as HFD in early stages of development and that can predispose to pathological conditions as relevant as obesity. New experiments will be needed to better elucidate the functional brain effects of HFD in this animal model of childhood and juvenile obesity.

Keywords: HFD, dopamine, serotonin, glutamate, GABA, males, females, y lateral septum.

3. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por el aumento de la grasa corporal asociada a un mayor riesgo para la salud. La clasificación de la obesidad se realiza a través de la medición del índice de masa corporal (IMC), estableciéndose que individuos con un IMC igual o superior a 30 kg/m² son considerados obesos (Moreno, 2012). En este contexto, se ha establecido que la obesidad es un factor de riesgo para enfermedades no transmisibles como: cardiovasculares, trastornos del aparato locomotor y algunos tipos de cánceres, entre otros.

A nivel epidemiológico, la obesidad en el mundo ha aumentado su prevalencia durante las últimas décadas, donde el 39% de adultos mayores de 18 años tienen sobrepeso y de ellos 650 millones son obesos (Ginebra., 2019). La situación no es muy distinta en nuestro país, la prevalencia de sobrepeso y obesidad es de aproximadamente 78%, donde un 34,1% de los adultos son obesos y 44,5% de los niños tienen sobrepeso u obesidad (CHILE © MINISTERIO DE SALUD, 2019). Además, se presenta con una mayor prevalencia en los estratos socioeconómicos bajos y con un aumento constante en la población escolar (Kain et al., 2005). En relación con las diferencias sexuales en nuestro país, podemos constatar que las personas de sexo biológico masculino presentan un 28,6% de obesidad versus un 33,7% en personas de sexo biológico femenino, constatando que es una enfermedad relacionada con el funcionamiento metabólico u homeostático (Departamento de Epidemiología División de Planificación Sanitaria Subsecretaría de Salud Pública, noviembre 2017).

Sin duda el contexto alimentario que se vive actualmente y la disponibilidad de alimentos obesogénicos (ricos en azúcares y grasa) impulsa al desarrollo de una ingesta hedónica caracterizada por una motivación placentera frente a la comida sin la necesidad de tener hambre o de dejar de comer cuando haya saciedad (Berthoud, 2011; Egecioglu et al., 2011; Lee and Dixon, 2017). En este contexto, el control alimentario está determinado por factores homeostáticos relacionados con el metabolismo y hedónicos involucradas con el placer y motivación, sin embargo, entender cómo la ingesta de alimentos obesogénicos afecta la neurofisiología de las áreas cerebrales asociadas al control de la alimentación es una pregunta que no ha sido completamente respondida. ***A lo largo de esta tesis se usó un modelo animal de obesidad infanto-juvenil inducida por dieta, desde el día postnatal 21 al 66, para evaluar cambios neuroquímicos y conductuales producidos en septum lateral (SL), una estructura cerebral que regula tanto el control homeostático como hedónico de la alimentación.***

3.1 AREAS CEREBRALES ASOCIADAS AL CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN

Las principales áreas cerebrales involucradas en el proceso de la ingesta alimentarias son: la corteza prefrontal (PFC) que regula la acción y decisión de generar el acto de comer; la amígdala que participa en el procesamiento y almacenamiento de reacciones emocionales asociadas a la ingesta de alimentos, el hipocampo que se asocia a memoria episódica y espacial, que es fundamental para aprender a identificar y conseguir los alimentos (Volkow et al., 2017) y, septum lateral (SL) el cual es una importante estación integral de relevo de información que conecta el hipocampo con el hipotálamo. Sin embargo, el control homeostático de la alimentación está dado por el hipotálamo y sus núcleos, como: hipotálamo lateral (LH), hipotálamo ventromedial (VMH), hipotálamo paraventricular (PVN) y núcleo arcuato (ARC), mientras que el control hedónico de la alimentación está regulado por áreas del cerebro como área tegmental ventral (VTA) y sus proyecciones hacia núcleo accumbens (NAcc), estriado dorso lateral (DLS) y PFC (Volkow et al., 2017).

3.1.1 HIPOTÁLAMO Y CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN

El hipotálamo es un núcleo cerebral ubicado en el diencefalo y dividido en tres regiones con funciones fisiológicas específicas: Anterior (o preóptico), Medial (o Tuberal) y Posterior (o Mamilar). Específicamente en la zona medial, se sitúa el área hipotalámica lateral (HL) que constituye el 45% del área hipotalámica total (Palkovits M, 1980), la cual se caracteriza por no ser un núcleo, sino más bien contener una población heterogénea de neuronas que se encuentran dispersas de forma difusa, y por ser la zona más interconectada del hipotálamo, esto le permite recibir gran variedad de información interoceptiva y exteroceptiva, además de modular funciones cognitivas, motor esquelética, autonómica y endocrina (Berthoud and Münzberg, 2011). Además, HL consta de 15 poblaciones distintas de neuronas glutamatérgicas, 15 de neuronas GABAérgicas y 11 tipos de células no neuronales (Mickelsen et al., 2019). Existen otras áreas del hipotálamo medial que también han sido asociadas con la regulación de la ingesta de alimentos, por ejemplo, el hipotálamo ventromedial (VMH) el cual es conocido como el “centro de la saciedad”, ya que la activación eléctrica de este núcleo produce saciedad, mientras que la lesión electrolítica produce un aumento en la ingesta de alimentos (Stuber and Wise, 2016). Además, la activación eléctrica del HL, conocido como el centro del hambre produce un aumento de la ingesta de alimentos (Delgado and Anand, 1953) y una lesión electrolítica de este núcleo produce una disminución de la alimentación (Sweeney and Yang, 2016). **En resumen, el HL es un núcleo fundamental en la regulación de la ingesta de alimentos y otras áreas cerebrales interconectadas, como el septum lateral (SL), el cual también es esencial para el control fisiológico de la alimentación. Una desregulación de estas áreas podría**

formar parte de los eventos fisiopatológicos que afectan a la homeostasis alimentaria y conducen al sobrepeso y obesidad.

3.1.2 SEPTUM LATERAL E INGESTA DE ALIMENTOS

El septum es una estructura del sistema límbico que se divide en tres regiones: medial, lateral y posterior (Swanson and Cowan, 1979). El SL está principalmente mediado por neurotransmisor GABA (ácido gamma amino butírico), y por ende, neuronas GABAérgicas de proyección e interneuronas que regulan procesos fisiológicos relacionados con la función cognitiva y respuestas humorales (Jakab and Leranth, 1990a;b). En varias líneas de investigación se evidencia que el SL es una importante estación integral de relevo de información que conecta el hipocampo con el hipotálamo (Swanson and Cowan, 1979) (Swanson and Cowan, 1977). En este contexto neuroanatómico, el SL recibe información aferente del tipo glutamatérgica desde el hipocampo, gatillando la activación de las neuronas GABAérgicas del SL (Assaf and Miller, 1977). Mientras que proyecciones eferentes del SL son de origen GABAérgico y se proyectan principalmente al hipotálamo lateral, observándose que una activación del SL produce una inhibición del HL. ***Sin embargo, el rol fisiopatológico del SL en la conducta alimentaria de animales obesos no ha sido dilucidado.***

El SL no sólo estaría involucrado en el control homeostático de la ingesta de alimentos, es decir, favorecer la ingesta de alimentos frente a necesidades metabólicas o reducir la ingesta de los mismos frente a un exceso de alimentación, sino que también está relacionado con el *circuito de la recompensa*, recibiendo proyecciones dopaminérgicas desde VTA (Assaf and Miller, 1977; Gaspar et al., 1985). A continuación, revisaremos los mecanismos neurobiológicos involucrados en el control de la ingesta de alimentos.

3.2 CONTROL HOMEOSTÁTICO DE LA INGESTA ALIMENTARIA

Las hormonas periféricas como ghrelina, leptina e insulina, participan en el control homeostático de la alimentación modulando la actividad de neuronas del núcleo arcuato (ARC) (Klok et al., 2007). Desde el estómago se secreta la ghrelina la cual activa las neuronas orexinérgicas (AGRP/NPY) productoras del péptido relacionado con Agouti (AGRP) y del neuropéptido tirosina (NPY). Estas neuronas AGRP/NPY inhiben a neuronas anorexigénicas (POMC/CART) del PVN y activan a neuronas del LH que conductualmente aumentan la ingesta de comida (Klok et al., 2007). Después de la ingesta de alimentos, la secreción de hormonas como la leptina, producida por el tejido adiposo blanco, o insulina, producida por células β -pancreáticas, estimulan neuronas glutamatérgicas del VMH que estimulan a neuronas anorexigénicas productoras de los péptidos pro-opiomelanocortina (POMC) y del transcrito relacionado con cocaína y anfetamina (CART) del ARC. Estas neuronas POMC/CART liberan el péptido α -MSH en el PVN, disminuyendo la ingesta de alimentos (ver figura 1).

En este control homeostático de la alimentación se recalca la importancia de HL debido a ser caracterizado, ya desde los años 50', como "centro del hambre"(Delgado and Anand, 1953), sin embargo, en los últimos años se han conocido nuevas conexiones con otras zonas del sistema límbico, como por ejemplo SL. Su estrecha relación radica, en que curiosamente, las principales eferencias GABAérgicas que son proyectadas hacia HL provienen desde SL (Swanson and Cowan, 1979). Por ende, esta inhibición septal sobre el HL puede ser producida por una activación hipocampal excitatoria que es la principal vía activante del SL a través de la liberación de glutamato (GLU). En este contexto, Sweeney & Yang (Sweeney and Yang, 2015), demostraron que expresando DREADD (Receptor diseñado exclusivamente activado por una droga de diseño) derivado del receptor muscarínico tipo 3 hM3Dq, que corresponde a un receptor de diseño biosintético acoplado a la proteína Gq y solamente activado por el ligando exógeno Clozapina N-Oxido (CNO), en neuronas glutamatérgicas del giro dentado, principal área de proyección hacia el SL, produce una disminución de la ingesta de alimentos, mientras que la expresión de DREADD derivado del receptor muscarínico tipo 3 (hM4Di, acoplado a la proteína Gi/o) aumenta la alimentación. Cabe señalar, que los autores usaron un trazador retrógrado que lleva a la expresión de los DREADDs en la vía neural exclusiva que comunica el hipocampo con el SL. Por lo tanto, la conectividad neural hipocampo-LS-LH es una importante vía de control fisiológico del proceso de alimentación. Sin embargo, los cambios fisiopatológicos en esta vía asociados a la ingesta crónica de comidas obesogénicas no ha sido estudiada.

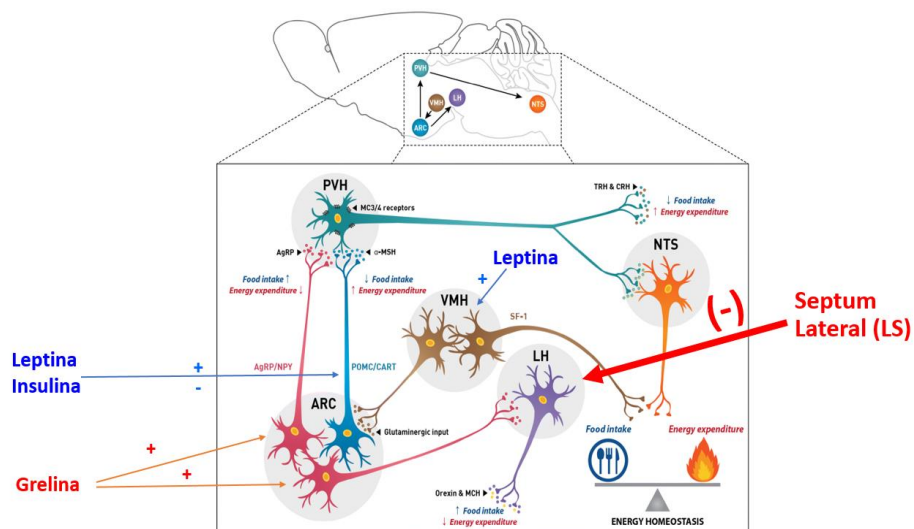


Figura 1. Control homeostático de la ingesta alimentaria. Adaptada Seong et al. 2019(Seong et al., 2019)

3.3 CONTROL HEDÓNICO DE LA ALIMENTACIÓN

El control hedónico de la alimentación está regulado por el sistema de la recompensa, también conocido como circuito mesolímbico, el cual está formado por neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que

proyectan sus axones desde el área tegmental ventral (VTA) a áreas límbicas como el núcleo accumbens (NAcc), cuerpo estriado dorsal (DLS) y corticales como la corteza prefrontal (PFC)(Kalivas et al., 2006). Estas neuronas dopaminérgicas del VTA se encuentran tónicamente inhibidas por interneuronas GABAérgicas (Gysling and Wang, 1983; Johnson and North, 1992), esto mantiene controlada la liberación de dopamina (DA) en NAcc .

En este sentido, las drogas de abuso como cocaína, amfetamina, alcohol, nicotina y morfina entre otras, estimulan la liberación de DA en NAcc(Di Chiara and Imperato, 1988) que se asocia a las propiedades recompensantes de estas drogas de abuso. Sin embargo, la activación fisiológica de este circuito cerebral tiene por objetivo producir placer mediante recompensantes naturales esenciales para la supervivencia de las especies como el sexo y la comida(Pfaus et al., 1990;Bassareo and Di Chiara, 1997). En este último contexto, se ha demostrado que comidas altamente palatables, ricas en grasa y dulces producen un aumento en la liberación de DA en NAcc (Bassareo and Di Chiara, 1997), enseñando a nuestro cerebro que son estímulos placenteros y que son conductas que debemos repetir.

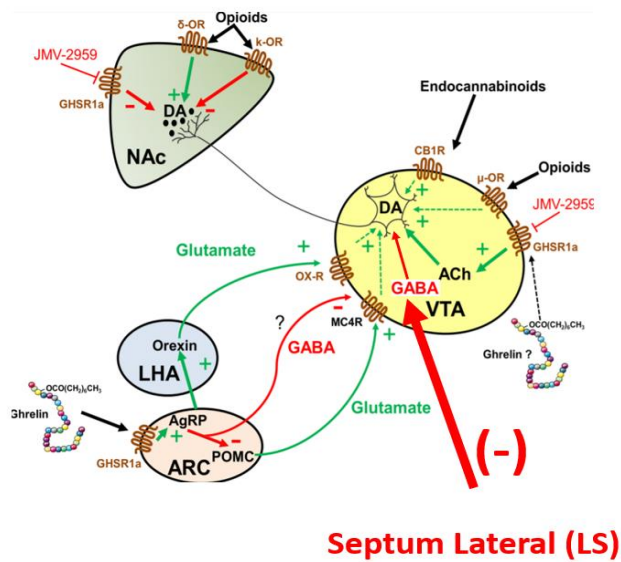


Figura 2. Control hedónico de la ingesta alimentaria (Al Massadi et al., 2019)

3.4 INTERACCIÓN DEL CONTROL HOMEOSTÁTICO Y HEDÓNICO DE LA ALIMENTACIÓN

La alimentación está determinada por un control homeostático y hedónico, este último, en humanos se asocia factores cognitivos, emocionales y de recompensa. El agotamiento de energías impulsa la ingestión de alimentos, pero también lo logran las decisiones cognitivas/ejecutivas de la corteza cerebral sin ninguna señal de agotamiento de energía, tal como ocurre cuando se consume algún alimento sólo por placer, incluso si el sujeto está saciado. La evidencia en animales de experimentación indica que las vías neurales

y periféricas se distinguen pero se superponen, impulsando la alimentación homeostática y hedónica (Swanson and Cowan, 1979; Sweeney and Yang, 2016).

Entre los recompensantes naturales están el sexo y la alimentación, en este sentido específicamente en relación con el consumo de azúcar, hay dos aspectos gratificantes principales: la nutrición y el sabor. Los estudios con roedores han indicado que estos dos aspectos son distintos y dissociables y pueden seguir diferentes vías neuronales (Swanson and Cowan, 1977; Jakab and Leranth, 1990b). La recompensa nutritiva del azúcar en los ratones causa la liberación de DA principalmente en el estriado dorso-lateral (DLS) y la recompensa por el dulzor se concentra en el NAcc. Ambas recompensas nutritivas y gustativas son vías distintas, pero están significativamente interrelacionadas, ya que existe evidencia que en ratones modificados para la interrupción de la señalización del receptor DRD2 en NAcc, exhiben un consumo de sacarosa más perseverante e impulsivo pero menos eficientes en la metabolización de la glucosa, por ende esto sugiere que DRD2 en el NAcc son esenciales para el refuerzo/recompensa del consumo de glucosa y de su regulación en niveles periféricos (Carnes et al., 1990).

Así mismo, existe evidencia que en ratas con menor expresión de DRD2 exhibieron una ingesta más compulsiva de alimentos ricos en grasas altamente palatables, en consecuencia, el azúcar y la grasa consumidos juntos es una combinación que ayuda a mejorar la palatabilidad de los alimentos procesados, que en la mayoría se consumen en exceso, y por lo tanto llevan a subir de peso.

Además, se ha evidenciado que las hormonas periféricas que regulan el control homeostático de la alimentación también regulan el control hedónico. Es el caso de ghrelina, que a través de la activación de su receptor GSH-R₁, activa directamente a las neuronas dopaminérgicas del VTA y a sus terminales en NAcc, provocando un aumento en la liberación de DA (Al Massadi et al., 2019). Por otro lado, se ha observado que la recaptación de DA en VTA a través de su transportador (DAT) se aumenta por efecto de insulina, la cual promovería la fosforilación del transportador (Stuber, 2012). Finalmente, las neuronas orexigénicas del LH productoras del péptido orexina (hipocretina) proyectan sus axones hacia VTA, produciendo la activación de neuronas dopaminérgicas (Aston-Jones and Cohen, 2005). En este contexto, el Dr. Rodrigo España (Universidad de Drexel, EEUU), demostró que la administración intra-VTA de un antagonista del receptor de orexina tipo 1 (OX₁), reduce la liberación de DA inducida por cocaína en NAcc (España et al., 2010). La integración de ambos sistemas y los efectos de las hormonas asociadas a la alimentación se resumen en la figura 2.

3.5 ROL DE SEPTUM LATERAL EN EL CONTROL DE LA ALIMENTACIÓN

Estudios pioneros de Olds y Milner (Olds and Milner, 1954), muestran que el SL juega un rol importante en el control hedónico de la alimentación. En estos experimentos, animales fueron entrenados para realizar una respuesta operante al recibir estimulación eléctrica en ciertas regiones cerebrales. Se demostró que

el SL mantiene la autoestimulación a expensas de una recompensa natural como la comida. Otros estudios demuestran que la autoestimulación eléctrica de VTA proyecta fibras que incrementan la actividad metabólica, medida por la utilización de desoxiglucosa, en campos terminales del VTA discretos que incluyen el núcleo accumbens, SL, hipocampo y tálamo mediodorsal (Esposito et al., 1984). Sheehan revisó la evidencia disponible que respalda el rol del SL en la conducta adictiva y otras psicopatologías como la psicosis y la ansiedad (Sheehan et al., 2004). En nuestro país Katia Gysling y sus colegas han estudiado el rol del SL en los procesos adictivos. En este sentido, hemos demostrado que la administración sistémica de morfina (Sotomayor et al., 2005), anfetaminas intra-SL y N, N, dimetil-tioamfetamina, incrementan los niveles extracelulares de DA en el SL (Sotomayor-Zárte et al., 2010; Sotomayor-Zarate et al., 2014). A nivel circuital y como nos muestra la figura 3 (Scopinho et al., 2008), el SL es una estación de relevo de información neuronal entre hipocampo e hipotálamo y también proyecta eferencias hacia VTA. En este contexto, se demostró (Luo et al., 2011; Vega-Quiroga et al., 2018), que la activación del SL inhibe a interneuronas GABAérgicas de VTA lo que lleva a la activación de las neuronas dopaminérgicas. Estos resultados nos demuestran que neuronas dopaminérgicas del VTA, las cuales son activadas por drogas de abuso, podrían gatillar un aumento de DA en el SL. Sin embargo, cambios en la neurotransmisión dopaminérgica en el SL modulada por la exposición crónica a comida obesogénica no ha sido estudiada previamente.

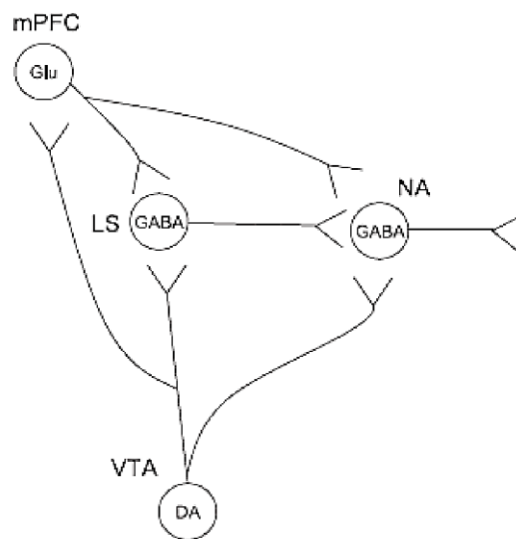


Fig. 3. Modelo por el cual el septum lateral (SL) contribuye a la regulación de la función del núcleo accumbens (NA). El SL recibe proyecciones dopaminérgicas desde el área tegmental ventral (VTA) y glutamatérgica de la corteza prefrontal medial (mPFC). Cabe señalar que la principal entrada de información glutamatérgica es de origen hipocampal (Figura tomada de Swason, 1982).

Por otro lado, en 2016, Sweeney & Yang (Sweeney and Yang, 2016), corroboraron el rol del SL sobre el control alimentario, expresando DREADDS (hM3Dq y hM4Di) en neuronas GABAérgicas septales que se proyectaban específicamente hacia el HL demostrando una disminución y aumento de la ingesta de comida respectivamente. Farmacológicamente, la inhibición del SL por microinyecciones de baclofeno (agonista GABA-B) ha demostrado disminuir los efectos anorexigénicos del estrés por restricción, aumentando la ingesta de alimentos (Mitra et al., 2015).

Otra serie de neurotransmisores y neuropéptidos cerebrales y periféricos afectan la ingesta de alimentos modulando la actividad del SL. Por ejemplo, la microinyección de noradrenalina en el SL aumenta la ingesta de comida, la cual es bloqueada por la microinyección conjunta de un antagonista alfa 1 adrenérgico, sugiriendo que la activación de interneuronas GABAérgicas del SL son reguladas por el sistema noradrenérgico (Scopinho et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que el SL y el HL expresan receptores para grelina (GHS-R), los cuales al ser activados modulan neuronas que controlan la distensión gástrica la cual es una señal periférica de saciedad (Gong et al., 2013;Gong et al., 2014). Además, inyecciones intra-SL de grelina aumentaron la ingesta de alimentos hasta 4 h después de la administración, y esto fue bloqueado por microinyecciones de antagonistas de GHS-R (Scopinho et al., 2008).

Se debe mencionar que el LS recibe aferencias dopaminérgicas desde VTA (Al Massadi et al., 2019), las cuales al igual que el NAcc, se encuentran controladas por interneuronas GABAérgicas del propio núcleo. En este contexto, en el año 2005 se demostró, utilizando microdiálisis *in vivo* con dos cánulas, una en LS y otra en VTA, que la perfusión por microdiálisis reversa de morfina en VTA produce una caída en los niveles extracelulares de GABA en VTA que se relaciona con un aumento en la liberación de DA en LS (Sotomayor et al., 2005). En el año 2011, se planteó que la vía hipocampo-LS-VTA participa activamente en la respuesta a drogas de abuso como cocaína (Luo et al., 2011). De hecho, se observó que la estimulación theta en hipocampo demostraba que en VTA neuronas dopaminérgicas se excitaban y otro grupo se inhibía. Además, las neuronas que se excitaban en VTA disminuían su excitación cuando se inactivaban farmacológicamente el LS con baclofeno y muscimol, mientras que las neuronas inhibitorias aumentaban su excitación cuando LS se inhibía (Luo et al., 2011). Finalmente, en el año 2017, se demostró neuroquímicamente, utilizando microdiálisis cerebral *in vivo*, que la activación del LS con un estímulo depolarizante produce el aumento de liberación de DA y GABA en VTA (Vega-Quiroga et al., 2018). En este caso la estimulación del LS asociada a la perfusión en VTA de bicuculina, un antagonista GABA_A, inhibió el aumento de DA en VTA, mientras que la perfusión de indiplon, un modulador positivo GABA_A, aumentó los niveles extracelulares de DA en VTA (Vega-Quiroga et al., 2018).

En resumen, para el planteamiento de la hipótesis y objetivos de esta tesis es necesario recordar lo siguiente:

- La evidencia muestra un rol del SL en la regulación fisiológica de la ingesta de alimentos a través de una inhibición directa sobre HL (vía hipocampo-SL-HL), mientras que, a través de proyecciones GABAérgicas septales a VTA, se produce una activación de neuronas dopaminérgicas a través de la inhibición de interneuronas GABA del VTA.
- Algunos estudios han investigado que los cambios inducidos por exposiciones repetitivas de dieta alta en grasa en estos núcleos cerebrales pasan por alto su posible rol en la fisiopatología de trastornos alimentarios como conductas de sobrealimentación que pueden gatillar obesidad.
- En consecuencia, en la presente investigación se buscarán respuestas sobre cómo se ve afectado el rol de SL bajo una condición de dieta alta en grasa.

4. HIPÓTESIS

Según los antecedentes expuestos y considerando las implicancias posibles del SL y núcleos asociados en un contexto de alimentación altamente palatable, se plantea la siguiente hipótesis:

“LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A UNA DIETA ALTA EN GRASA EN UN MODELO DE OBESIDAD INFANTO JUVENIL DE RATAS SPRAGUE DAWLEY, PRODUCE UNA DESREGULACIÓN NEUROQUÍMICA EN EL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES (DA, GABA, GLU, 5-HT) EN SL Y OTROS NÚCLEOS ASOCIADOS AL CONTROL DE LA INGESTA DE ALIMENTACIÓN”.

Posiblemente, esta desregulación en el contenido de neurotransmisores en SL y núcleos asociados podría repercutir en una mayor activación de HL, promoviendo la sobrealimentación causante de la obesidad.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

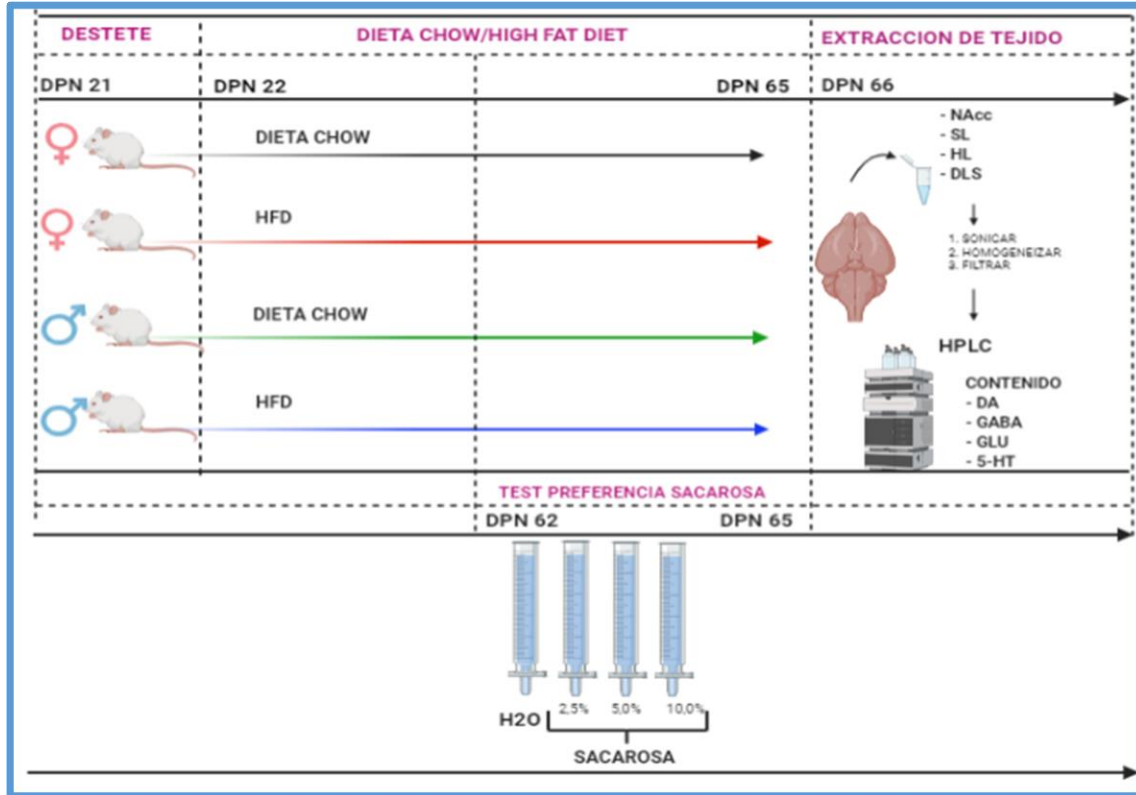
“Evaluar los cambios neuroquímicos en neurotransmisores de áreas cerebrales asociadas al control de la ingesta de alimentos en un modelo de obesidad inducida por dieta en ratas Sprague-Dawley, expuestas a una prueba de preferencia al consumo de sacarosa”.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el grado de preferencia por la ingesta de soluciones recompensantes en ratas Sprague-Dawley de ambos sexos expuestas por seis semanas a dieta alta en grasa, usando la prueba de preferencia por sacarosa.
2. Determinar el contenido de neurotransmisores monoaminérgicos y aminoacidérgicos en NAcc, SL, HL y DLS de ratas Sprague-Dawley de ambos sexos expuestas por seis semanas a dieta alta en grasa, usando HPLC acoplado a detección electroquímica y fluorométrica.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

La siguiente figura detalla los procedimientos experimentales utilizados en el desarrollo de esta tesis:



DPN: día post-natal; SL: septum lateral; NAcc: núcleo accumbens; HL: hipotálamo lateral; DLS: estriado dorsal HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; DA: dopamina; GABA: Ácido γ -aminobutírico; GLU: glutamato; 5-HT: serotonina.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico.

7.2 ANIMALES

Se utilizaron 40 ratas Sprague-Dawley de ambos sexos provenientes de 4 camadas, las cuales fueron alojadas en un máximo de 5 ratas por cajas en una sala de mantención del Instituto de Fisiología (Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso), bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($54 \pm 5\%$) y ciclos de luz – oscuridad de 12 horas (encendiendo las luces a las 08:00 am). El peso de los animales fue registrado durante los días hábiles de la semana y fines de semana para establecer curvas de crecimiento. Desde el día postnatal (DPN) 21, día normalmente asociado al destete, y hasta PND 61 los animales fueron mantenidas en condiciones de disponibilidad de agua y comida *ad libitum*, agrupadas por sexo y por grupo asignado a dieta control o HFD. Desde DPN 62 hasta DPN 65 cada animal se dejó dispuesto en una caja individual para realizar la prueba de preferencia de sacarosa y el DPN 66 se realizaron las eutanasias y extracciones de tejido. Como esta tesis corresponde al desarrollo de objetivos específicos del proyecto FONDECYT Regular 120-0474 del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate, todas las certificaciones de bioética (BEA 154-20 y EBEA 154-20) y bioseguridad (BS002-20) fueron aprobados por los respectivos comités institucionales y remitidas a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo del Gobierno de Chile.

7.3 DIETA

Los animales de experimentación fueron alimentados con comida control (Prolab RMH 3000 – Lab.Diet código 5P00) o con comida HFD (HFD 60 % Kcal fat, Research Diet, USA), según la organización de los grupos. Las dietas estuvieron disponibles *ad libitum*. Solo para la realización del test de preferencia a sacarosa realizado desde DPN 62 al DPN 65 se dejó en ayuna de agua a todos los animales durante 4 horas antes de comenzar el test. Una vez finalizada la prueba de preferencia de sacarosa los animales volvieron a las condiciones iniciales de agua y comida *ad libitum* descritas previamente.

7.4 REGISTRO DE PESO

El registro de peso se llevó a cabo pesando los animales en balanza granataria destinada exclusivamente para el uso en animales desde el DPN 21 hasta DPN 66 (incluyendo fines de semana y días feriados). El control de peso permitió observar el crecimiento de las camadas durante todo el tiempo del experimento y se consideró, según nuestro protocolo de supervisión animal, que una pendiente de peso positiva en esta curva se relaciona con una ganancia de peso normal y con un estado de salud general óptimo.

7.5 TEST PREFERENCIA DE SACAROSA

La prueba de preferencia de sacarosa (Sacarosa, Winkler) se realizó desde DPN 62 AL DPN 65. Cuatro horas antes de la prueba, se dejó a las ratas con acceso a su respectiva dieta, pero con restricción completa al agua de bebida. Posteriormente, por un periodo de cuatro horas más se llevó a cada rata a una caja individual, con acceso a cuatro probetas de 100 mL modificadas con las siguientes concentraciones de líquidos: 1) agua, 2) 2.5% P/v sacarosa, 3) 5% P/v sacarosa y 4) 10% P/v sacarosa. El horario elegido para realizar la prueba de preferencia por sacarosa fue durante el anochecer con el fin de registrar el consumo de líquidos en el horario más activo de las ratas. Sin embargo, los horarios de medición tienen una variación de 2,5 horas debido a la contingencia nacional asociada al toque de queda aplicado en la ciudad de Valparaíso entre los meses de agosto de 2020 a abril de 2021.

Los registros del consumo de sacarosa de cada rata se realizaron dos veces, luego de dos y cuatro horas respectivamente. Se usó luz roja para poder iluminar y ver el consumo de líquidos de cada probeta sin afectar el mantenimiento de las ratas ni su ciclo circadiano. Después, de la última medición se tomó a cada rata y se dejó en su caja inicial con acceso a comida y agua *ad libitum* hasta el siguiente día.

7.6 EUTANASIA DE ANIMALES Y MICRODISECCIÓN

Una vez finalizada la prueba de preferencia de sacarosa, específicamente DPN 66 se realizó la eutanasia de los animales con guillotina para animales menores (Modelo 51330, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Sus cerebros fueron rápidamente removidos y puestos en una matriz para cerebro de acero inoxidable (Modelo 68711, RWD Life Science, Shenzhen, P.R. China) sobre hielo y un microperforador (modelo 15076; diámetro 2,0 mm, Harris Uni-Core, Ted-Pella Inc., Redding, CA, USA) fue utilizado para microdisectar las siguientes estructuras cerebrales: núcleo accumbens (NAcc), septum lateral (SL), hipotálamo lateral (HL) y cuerpo estriado (DLS). Todos estos tejidos fueron pesados en una balanza analítica (Modelo JK-180, Chyo, Japón) y almacenados en un tubo Eppendorf de 1.5 mL a -80°C hasta su posterior uso.

7.7 MEDICIÓN CONTENIDO TISULAR DE NEUROTRANSMISORES

Las áreas cerebrales almacenadas fueron homogenizadas en 400 μL de ácido perclórico 0,2M utilizando un sonicador (Modelo XL 2005, Microson Ultrasonic Cell Disruptor, Heat Systems, Farmingdale, NY, USA). El homogeneizado se centrifugó a 12.000 g por durante 15 minutos a 4°C (modelo Z233MK-2, Hermle Labortechnik GmbH Wehingen, Alemania). El sobrenadante se filtró (Modelo EW-32816-26; 0,2 μm , HPLC Syringe Filters PTFE, Cole-Parmer, Instrument Company, Vernon Hills, IL, EEUU) y la solución filtrada fue inyectado en HPLC acoplado a detección electroquímica (EC) para la cuantificación de DA, GLU y GABA.

7.7.1 DETERMINACIÓN DE DA Y 5-HT POR HPLC-EC

La determinación de DA y 5-HT se realizó utilizando un HPLC-EC con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna C18 (Modelo Kromasil 100-3.5-C18, AkzoNobel, Bohus, Suecia) y un detector electroquímico (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0.5 nA. La fase móvil que se utilizó para la determinación de DA fue bombeada a un flujo de 0.2 mL/min y tuvo la siguiente composición: 0.1 M de NaH_2PO_4 , 1.25 mM de ácido 1-octanosulfónico, 1.0 mM de EDTA y 8.0% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 3,0). Las áreas de los picos de DA en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia que se utilizaron para calcular las concentraciones de DA, a través de una curva de calibrado realizada en el programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). Bajo estas condiciones, el tiempo de retención para DA fue cercano a los 11 minutos y de 5-HT de 30 minutos. Cabe destacar que el fundamento analítico para esta técnica se basa en que las moléculas catecolaminérgicas, bajo las condiciones antes descritas, pueden ser oxidadas en la región del anillo catecol a una ortoquinona que produce 2 electrones por cada molécula oxidada de DA. Estas corrientes oxidativas son directamente proporcionales a la cantidad de moléculas oxidadas de neurotransmisores (ver figura 4). Mientras que los tiempos de retención están dados principalmente por la interacción de la cadena alifática con la fase estacionaria de la columna.

7.7.2 DETERMINACIÓN DE GLU Y GABA POR HPLC-FLUOROMÉTRICO

Para la cuantificación de GABA y GLU se realizó una reacción de derivatización pre-columna en la que se utilizó: (i) 20 μL del solución, (ii) 4 μL de buffer borato (pH 10.8), y (iii) 4 μL de reactivo fluorogénico (20 mg de ortoftaldehído y 10 μL de b-mercaptoetanol en 5 mL de etanol). Para la reacción de derivatización se esperó 90 segundos, para luego inyectar la muestra al sistema HPLC acoplado a detector fluorométrico (FD) (ver figura 4). Los filtros se configuraron para una longitud de onda de excitación de 350 nm y una

longitud de onda de emisión de 450 nm. El HPLC-FD está conformado por: 1) una bomba isocrática (modelo PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), 2) una columna de fase reversa C-18 (Kromasil 3-4.6; Suecia), y 3) un detector fluorométrico (modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). Se utilizó un gradiente isocrático para la separación de las muestras. La fase móvil contiene 0.1 M de NaH_2PO_4 y 24% CH_3CN (pH 5.7) el cual será bombeada a un flujo de 1 mL/min. El área de los peak correspondientes a GABA y GLU, se compararon con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones a través de una curva de calibrado realizada con un programa cromatográfico (ChromNAV 2.0, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón).

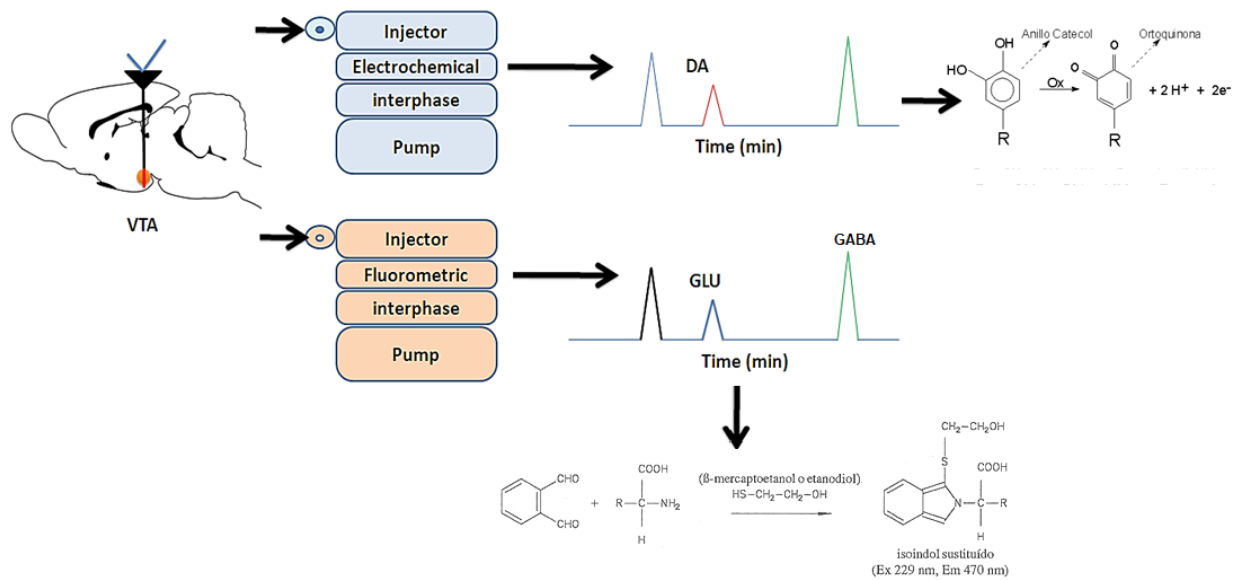


Figura 4. Esquema de la reacción e identificación de los neurotransmisores. El esquema representa la reacción e identificación de los peak de neurotransmisores al ser inyectados en el HPLC-EC (para detección de DA) y HPLC-FD (para detección de GLU y GABA).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del contenido de DA, GABA, GLU y 5-HT fueron expresados como el promedio de la concentración por mg de tejido \pm error estándar medio (SEM). Los resultados del peso de los animales fueron expresados como el peso en g \pm SEM, mientras que para el test de preferencia por sacarosa se midió el volumen ingerido en 4 h \pm SEM. El análisis estadístico realizado fue un análisis de varianza de dos vías (Two-way ANOVA) seguido de un post-test de Fisher's LSD. Todos los análisis estadísticos y el diseño de gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v8,0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

9. RESULTADOS

9.1 CARACTERIZACIÓN DE MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR HFD

El peso corporal de los animales fue registrado para ratas machos y hembras alimentados con HFD y dieta control desde el DPN 21 al DPN 62. La figura 7 muestra el valor de peso absoluto de animales de los grupos experimentales al DPN 62 (Fig. 7A) y un día después de finalizar la prueba de preferencia a sacarosa al DPN 66 (Fig 7B). En la figura 7A, los machos y hembras HFD ganaron una mayor cantidad de peso que machos y hembras controles (Test: anova de dos vías; $**p=0,0040$; $***p=0,0002$). Por otro lado, la ganancia de peso en machos HFD fue mayor que hembras HFD (Test: anova de dos vías; $****p<0,0001$), lo mismo se observó entre machos y hembras control (Test: anova de dos vías; $****p<0,0001$). Al DPN 67 se observó el mismo fenómeno anterior donde machos y hembras HFD ganaron mayor cantidad de peso que los machos y hembras control (Test: anova de dos vías; $*p=0,0471$; $***p=0,0002$). También la ganancia de peso en machos HFD fue mayor que hembras HFD (Test: anova de dos vías; $****p<0,0001$) y lo mismo se observó entre machos y hembras control (Test: anova de dos vías; $****p<0,0001$). Estos resultados confirman que el procedimiento experimental desarrollado en esta tesis corresponde a un modelo de obesidad inducida por dieta.

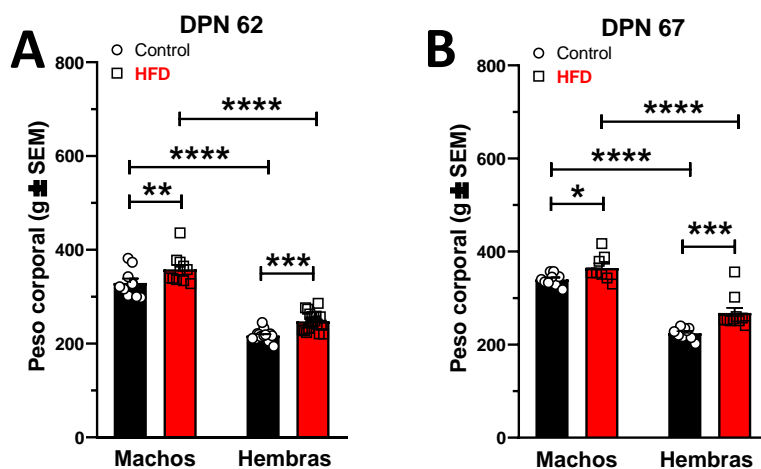


Fig 7. Peso de ratas macho y hembra alimentadas con dieta HFD y control desde el DPN 21 al DPN 67. El número de animales utilizados para los grupos experimentales fue de: ratas hembras control n=9, ratas hembras HFD n=9, ratas machos control n=9, y ratas machos HFD n=8. Los valores representados en el gráfico representan el promedio de peso (g) ± SEM.

9.2 ESTUDIO CONDUCTUAL DE PREFERENCIA POR SOLUCIÓN DE SACAROSA

Desde el día postnatal 62 al 65 se registró la cantidad de líquido consumido por cada rata de forma individual luego de tener a libre disposición cuatro concentraciones de líquidos en probetas modificadas rellenas con los siguientes líquidos: agua, 2.5% P/v sacarosa, 5% P/v sacarosa y 10% P/v sacarosa. Con respecto al consumo de líquido realizado por machos HFD y controles (Fig. 8), se observa un incremento diario en el consumo de la solución de sacarosa más concentrada y que otorga un mayor valor hedónico. Sin embargo, sólo el 4to día se observó que los machos HFD consumieron una mayor cantidad de solución de sacarosa al 10% que los machos controles (Test: anova de dos vías; * $p= 0,0153$). Además, el mismo día el consumo de la solución al 5% en sacarosa fue menor en los machos HFD respecto a los machos control (Test: Anova de dos vías; * $p= 0,0450$), indicando una clara preferencia en machos HFD por la solución con mayor valor recompensante.

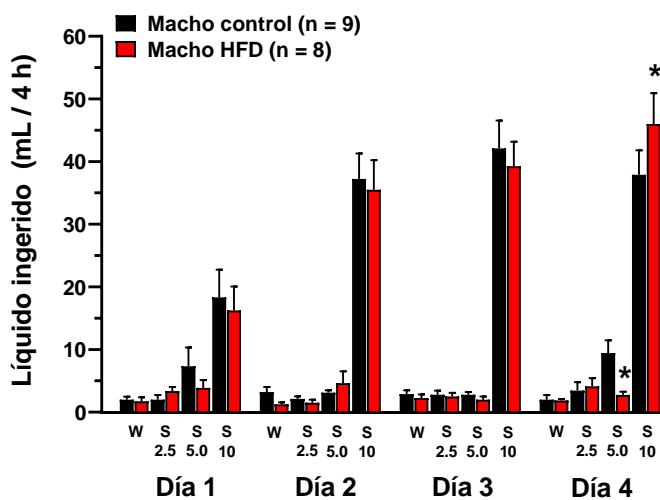


Fig 8. Consumo de líquidos agua, sacarosa al 2,5%, 5% y 10%, en machos alimentados con dieta control y HFD desde el DPN 21 al 62, durante cuatro días de medición. * $p < 0.05$ versus ratas control.

En el caso de las hembras, la situación es completamente distinta (Fig. 9), requiriendo una interpretación distinta de los resultados y que debiera ser demostrada por experimentos posteriores. En este caso tanto hembras controles como HFD presentaron un mayor consumo de la solución más concentrada de sacarosa respecto a las otras soluciones disponibles. Sin embargo, las hembras controles desde el 1er al 4to día consumen mayor cantidad de solución de sacarosa al 10% p/v en relación al grupo HFD (Test: anova de dos vías; ****p <0,0001; ***p= 0,001). Estos resultados nos podrían indicar que la exposición crónica a HFD afecta el grado de recompensa en ratas hembras por la solución de sacarosa de mayor valor hedónico. Sin embargo, otras pruebas conductuales y funcionales debieran ser realizadas para dilucidar esta hipótesis.

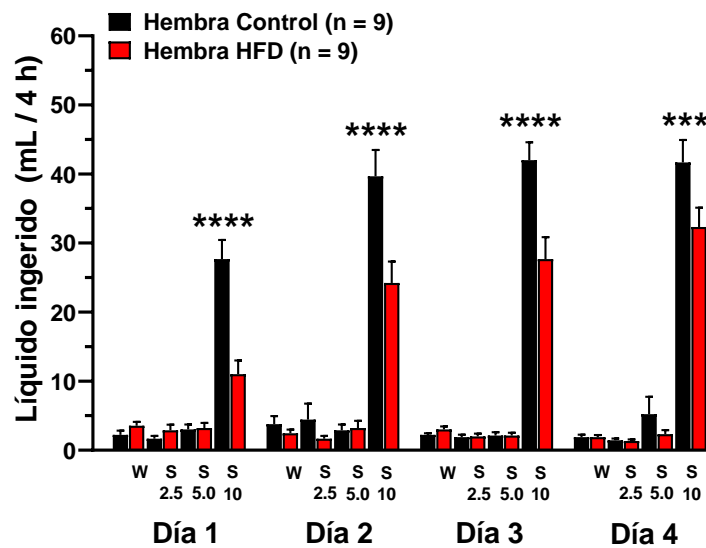


Fig 9. Consumo de líquidos agua, sacarosa al 2,5%, 5% y 10%, en hembras alimentados con dieta control y HFD desde el DPN 21 al 62, durante cuatro días de medición. ***p<0.001 y ****p<0.0001 versus HFD.

9.3 MEDICIÓN DE CONTENIDO TISULAR DE NEUROTRANSMISORES

9.3.1 CONTENIDO DE DA EN NUCLEO ACCUMBENS Y SEPTUM LATERAL

El contenido tisular de DA en NAcc (Fig. 10A) y SL (Fig. 10B) fue evaluado en ratas machos y hembras expuestas a HFD y dieta control. En NAcc el contenido de DA fue similar en animales del mismo sexo expuestos a HFD respecto dieta control. Sin embargo, una diferencia sexual en el contenido de DA fue observada entre machos y hembras control (Test: anova de dos vías; $**p= 0,0021$) y entre machos y hembras expuestas a HFD (Test: anova de dos vías; $*p= 0,0455$). En SL se observó que el contenido de DA en ratas machos expuestas a HFD En cuanto al contenido tisular de DA en SL (Fig. 10B), los machos HFD presentan menores niveles de DA en este núcleo con respecto a machos control (Test: anova de dos vías; $*p= 0,0437$).

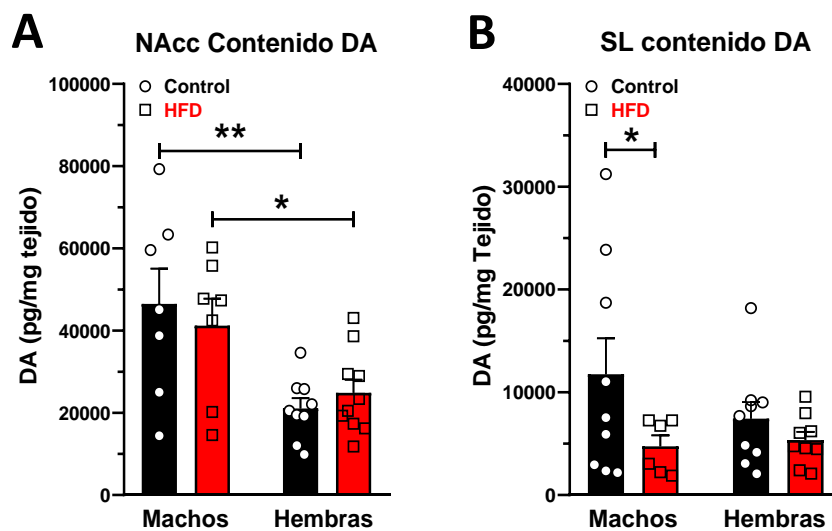


Fig 10. Contenido de DA en NAcc (A) y SL (B) de en machos y hembras alimentados con HFD por 6 semanas. $**p<0.01$ y $*p<0.05$

9.3.2 CONTENIDO DE GABA EN NUCLEO ACCUMBENS, SEPTUM LATERAL, HIPOTALAMO LATERAL Y ESTRIADO DORSAL

El contenido de GABA en los cuatro núcleos involucrados en el control de la alimentación fue medido usando HPLC-FD (Fig. 11A-D). Solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GABA en el SL de ratas hembras expuestas a HFD (Test: anova de dos vías; * $p=0,0304$), mientras que DLS solo se observó un aumento en el contenido de GABA en ratas hebras expuestas a HFD respecto a machos expuestos a la misma dieta (Test: anova de dos vías; * $p=0,0217$).

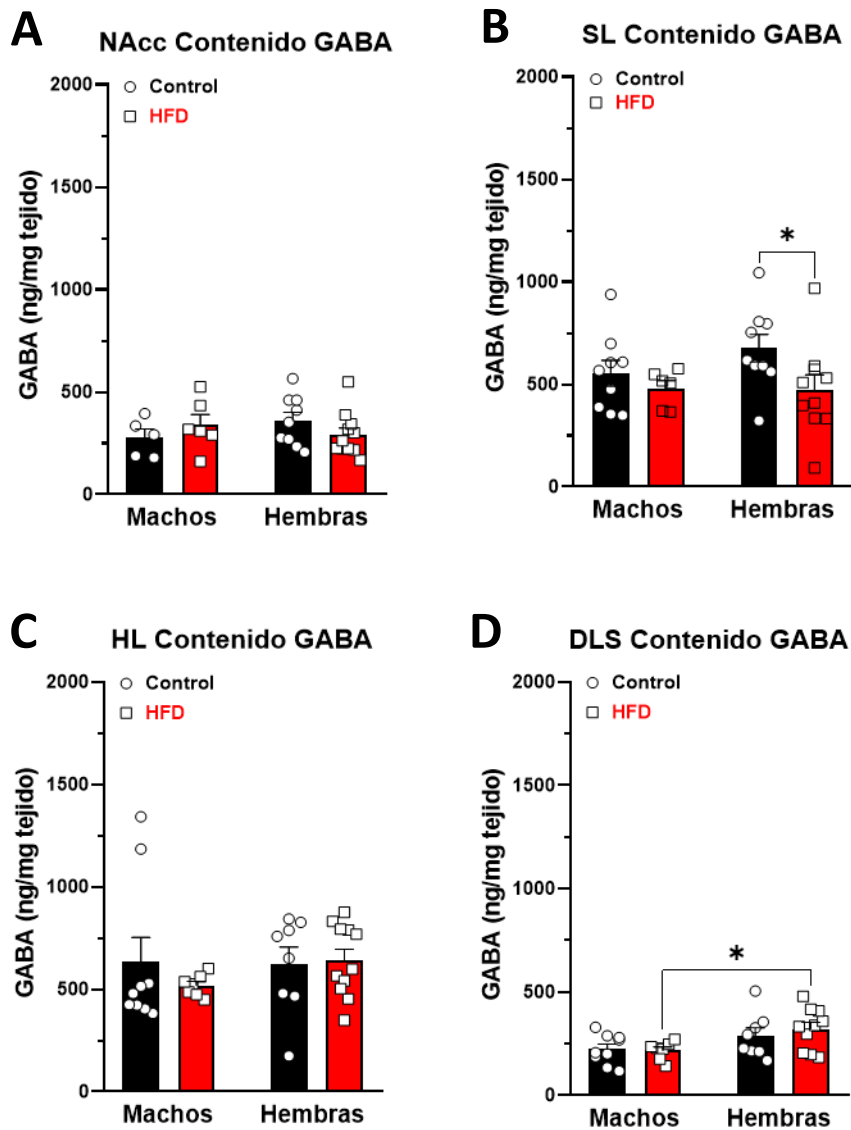


Fig 11. Contenido de GABA en NAcc (A), SL (B), HL (C) y DLS (D) de en machos y hembras alimentados con HFD por 6 semanas. * $p<0.05$

9.3.3 CONTENIDO DE GLU EN NUCLEO ACCUMBENS, SEPTUM LATERAL, HIPOTALAMO LATERAL Y ESTRIADO DORSAL

El contenido de GLU en los cuatro núcleos involucrados en el control de la alimentación fue medido usando HPLC-FD (Fig. 12A-D). Solo se observó una diferencia estadísticamente significativa en el contenido tisular de GLU asociada a una diferencia sexual en HL de ratas machos control respecto ratas hembras alimentadas con la misma dieta (Test: anova de dos vías; $**p=0,0031$).

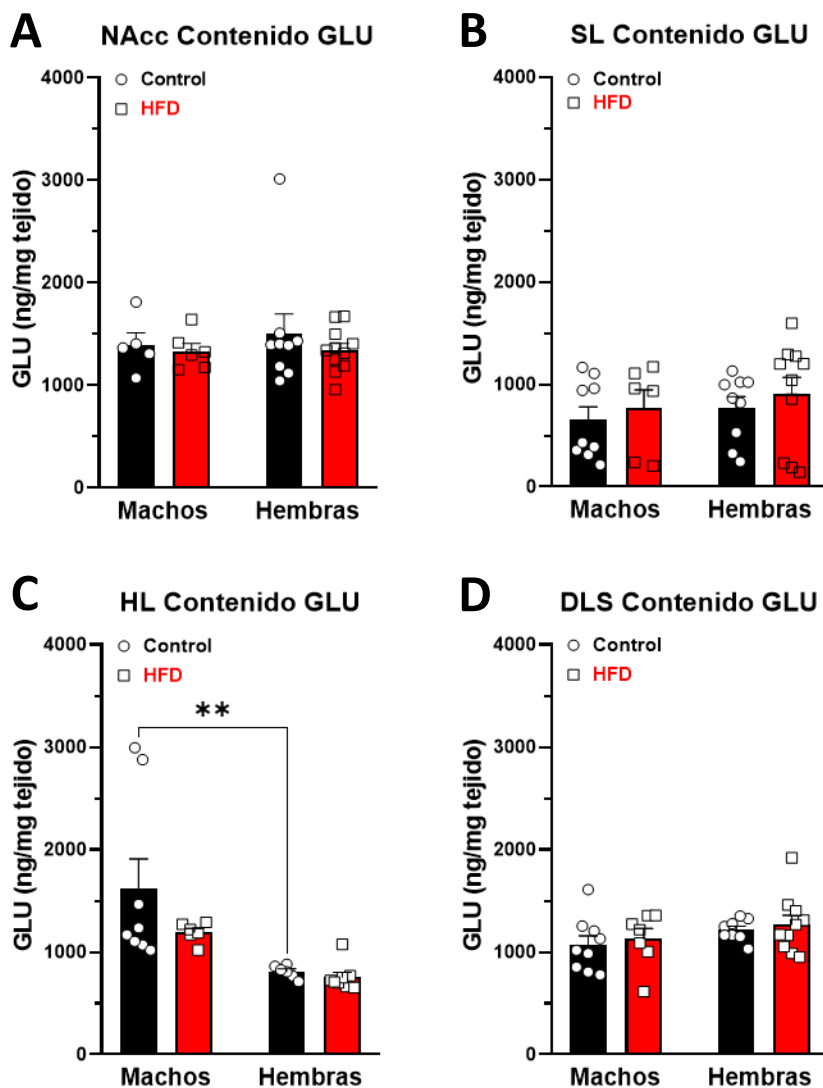


Fig 12. Contenido de GLU en NAcc (A), SL (B), HL (C) y DLS (D) de en machos y hembras alimentados con HFD por 6 semanas. $**p<0.01$

9.3.4 CONTENIDO DE 5-HT EN NUCLEO ACCUMBENS Y SEPTUM LATERAL

El contenido tisular de 5-HT en NAcc (Fig. 13A) y SL (Fig. 13B) fue evaluado en ratas machos y hembras expuestas a HFD y dieta control. En NAcc se observó que en ratas machos alimentadas con HFD el contenido de 5-HT fue estadísticamente menor que al cuantificado en ratas machos control (Test: anova de dos vías; * $p=0,0438$) (Fig. 13A). Además, se observó una diferencia sexual en el contenido de 5-HT en NAcc de ratas machos control respecto a hembras alimentadas con el mismo tipo de dieta (Test: anova de dos vías; * $p=0,0134$). Por otro lado, el SL (Fig. 13B) se observó en machos y hembras alimentadas con HFD un aumento significativo en el contenido de 5-HT respecto a machos (Test: anova de dos vías; **** $p<0,0001$) y hembras control (Test: anova de dos vías; **** $p<0,0001$).

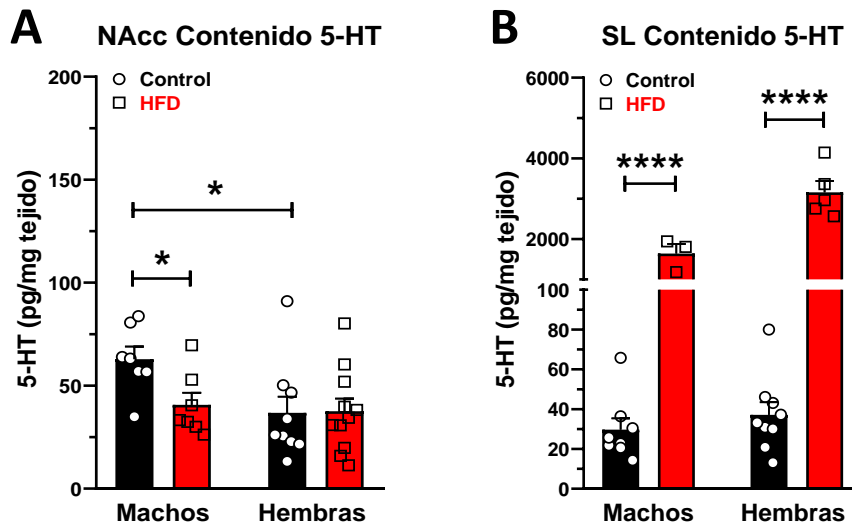


Fig 13. Contenido de 5-HT en NAcc (A) y SL (B) de en machos y hembras alimentados con HFD por 6 semanas. **** $p<0,0001$ y * $p<0,05$

10. DISCUSION

En esta tesis de magíster buscamos evaluar los efectos neurobiológicos de la exposición crónica a una dieta obesogénica (HFD) desde la infancia a la adultez temprana. Específicamente, estudiamos los cambios neuroquímicos en el contenido de neurotransmisores monoaminérgicos y aminoacidérgicos en estructuras cerebrales asociadas al control homeostático y hedónico de la alimentación (Gardner, 2011). Estos neurotransmisores (DA, 5-HT, GABA y GLU) fueron cuantificados en NAcc, SL, HL y DLS de ratas expuestas a HFD y posterior a una prueba de valor hedónico realizada midiendo el consumo de soluciones de sacarosa. Considerando los resultados antes descrito se discutirá la significancia fisiopatológica de estos hallazgos en el proceso de control de la ingesta de alimentos.

10.1 EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A HFD EN LA PREFERENCIA DE SACAROSA EN ANIMALES DE AMBOS SEXOS.

En la prueba de preferencia por soluciones de sacarosa se observó que los animales presentaron una mayor preferencia por la solución de sacarosa más concentrada. En el caso de los machos tratados con HFD se observó un mayor consumo de la solución de sacarosa al 10 % que ratas machos control. Este resultado se relaciona con datos publicados recientemente donde la exposición crónica a una dieta de cafetería aumentó la preferencia de los animales por soluciones con concentraciones más altas de sacarosa (32%) respecto a otras soluciones de más baja concentración (2%). Mientras que en animales alimentados con dieta control se observa una preferencia mayor por soluciones con concentraciones medias de sacarosa (8%) que por soluciones más concentradas (32%) (Fam et al., 2022). Los autores de esta investigación indican que los cambios inducidos por la dieta de cafetería en la preferencia por el sabor dulce ocurrieron en un contexto de cambios sustanciales en la motivación para buscar y consumir sacarosa, además de los elementos de palatabilidad propia de la dieta de cafetería. En consecuencia, los resultados obtenidos ratas macho HFD y control, también podrían deberse a un cambio inducido por la HFD sobre el circuito de la recompensa. Por otro lado, en el caso de las ratas hembras los resultados de consumo de soluciones de sacarosa demostraron que la solución más concentrada de sacarosa fue la de mayor valor hedónico para los animales. Sin embargo, al comparar el consumo de esta solución entre ratas hembras alimentadas con HFD respecto a dieta control, se observó una significativa reducción en el consumo de esta solución de sacarosa en los animales expuestos a HFD. Posiblemente, esto podría deberse por el efecto de los estrógenos, ya que se conoce que los estrógenos promueven una mayor recompensa debido al aumento de síntesis de tirosina hidroxilasa (TH), mayor contenido de DA y mayor liberación en NAcc que lo observado en ratas machos (Becker et al., 2001). En este contexto, aunque no medimos los niveles de estrógenos plasmáticos en ratas hembras control y HFD, se podría plantear como

hipótesis que la exposición a HFD disminuye los niveles de estrógenos plasmáticos, lo que se traduciría en una menor neuromodulación de este tipo de hormonas sobre el circuito de la recompensa. Sin embargo, debemos probar esta hipótesis evaluando la concentración sérica de las hormonas sexuales.

10. 2 EFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE DA EN NAcc Y SL.

Los resultados observados muestran que en NAcc hay mayor cantidad de DA en machos alimentados con HFD y controles, que en hembras HFD y control respectivamente, indicando diferencias sexuales tanto en el grupo control como experimental. Para comprender esta diferencia debemos recordar que la neurotransmisión DAérgica es fásica en cada compartimiento de NAcc y cumple diferentes roles en el comportamiento motivado, tal como fue demostrado por el grupo del Dr. Gaetano Di Chiara (Bassareo, 1999). En este trabajo se observó que la comida recompensante estimuló la transmisión de DA en el Shell del NAcc, pero no en el core del mismo núcleo. Por lo tanto, parte de las diferencias encontradas podrían deberse a la zona de NAcc donde se está midiendo el contenido de DA. Por otro lado, en relación a SL, los resultados muestran que los machos HFD presentaron menor contenido de DA que machos controles, lo que podría estar relacionado a que la dieta HFD produce una menor síntesis y liberación de DA en la vía VTA - SL, o que la HFD podría dar cuenta de una mayor metabolización mediada por enzimas como la monoamino oxidasa o catecol o-metil transferasa en esta misma vía. Sin embargo, no se dispone lamentablemente de los niveles de DOPAC, principal metabolito de DA en roedores, para establecer si hubo o no cambios en el contenido de DOPAC inducido por la dieta.

10. 3 EFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE GABA EN NAcc, SL, HL Y DLS.

Los resultados encontrados en relación al contenido tisular de GABA en SL, muestran que las hembras HFD presentan una menor cantidad de este neurotransmisor en relación a las hembras alimentadas con dieta control. A pesar que el contenido de GABA en HL no se afectó en hembras por acción de la HFD, hay que recordar que las principales proyecciones GABAérgicas de SL van hacia HL, por lo tanto, este menor contenido de DA septal podría estar relacionado con una menor función inhibitoria de SL sobre HL, favoreciendo la hiperfagia. Sin embargo, experimentos que demuestren a través de microdiálisis cerebral in vivo que los niveles de GABA en HL se ven afectado o que a través de electrofisiología dan cuenta de una menor comunicación sináptica serán necesarios para dilucidar esta hipótesis.

En un contexto obesogénico se ha descrito que en ratas macho alimentadas con HFD se reducen los niveles de GABA en corteza frontal e hipocampo (Sandoval-Salazar et al., 2016), lo que relacionaría el tipo de dieta con el funcionamiento de proteínas claves para la neurotransmisión GABAérgica. En este contexto, la HFD

produce en hipocampo e hipotálamo de ratones machos una disminución de los niveles del transportador vesicular de GABA respecto a ratones controles (Lizarbe et al., 2018). Sin embargo, en SL de ratas machos no observamos diferencias significativas en el contenido de GABA mediado por la exposición a HFD, lo que podría indicar que en esta área específica no se observan cambios significativos en su transportador vesicular de GABA, que da cuenta de los niveles extracelulares de GABA en la hendidura sináptica.

En el caso de DLS se observa que los machos alimentados con HFD presentan menor contenido de GABA que Hembras HFD. Para poder comprender esta diferencia debemos recordar que DLS está involucrado en la toma de decisiones motivadas por una recompensa, junto a otras zonas como NAcc, cuerpo estriado medial dorsal (DMS) (Burton et al., 2015). También, se conoce que en NAcc y DLS la actividad de GABAérgica de las neuronas espinosas medianas de proyección es modulada por receptores dopaminérgicos D1 y D2 (Owesson-White et al., 2016). Por lo tanto, si en machos HFD hay un menor contenido de GABA en DLS podría deberse a una modulación negativa por parte del neurotransmisor DA. En el caso de las hembras, en una situación control, en estudios de microdialisis *in vivo* se demostró que el estradiol atenúa la liberación de GABA estriatal estimulada por potasio, sin embargo, posiblemente en un contexto de dieta obesogénica puede verse afectada dicha atenuación y podría observarse un mayor contenido de GABA.

10.4 EFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE GLU EN NAcc, SL, HL Y DLS.

Los resultados obtenidos muestran que machos controles presentan mayor contenido tisular de GLU que hembras controles, sin embargo, esta es la respuesta control ¿qué hay en relación a los grupos HFD? podría estarse presentando una desregulación del contenido de GLU asociado a su síntesis, vesículas transportadoras, receptores, aminoácidos de síntesis, etc. ya que hay evidencia que inyecciones de GLU en HL, provocan la alimentación de animales de experimentación, actuando a través de varios subtipos de receptores glutamatérgico, especialmente a través de receptores NMDA (Stanley et al., 2011). Por lo tanto, el que no haya cambios en animales HFD demuestra que el centro del hambre está desregulado.

10.5 EFECTOS NEUROQUIMICOS DE HFD SOBRE EL CONTENIDO DE 5-HT EN NAcc Y SL.

La actividad de 5-HT ha estado ampliamente implicada en la regulación de los comportamientos de alimentación tanto en humanos como en modelos animales (Pratt et al., 2017) . En relación al comportamiento de este neurotransmisor en NAcc, se ha evidenciado que en una situación control, la activación del receptor 5-HT_{1a} reduce la ingesta de alimentos y agua en ratas macho (Clissold et al., 2013) y que la inyección de 5-HT en NAcc reduce la motivación por comida (Fletcher et al., 2002). Sin embargo, la modulación de receptores de serotonina en NAcc tienen efectos diferenciales los agonistas de 5-HT_{1/7},

5-HT_{2c} y 5-HT₄, ya que reducen la ingesta de alimentos, mientras que los agonistas de los receptores 5-HT₃ y 5-HT₆ aumentan la ingesta de alimentos (Jean et al., 2007; Pratt et al., 2012; Pratt et al., 2017). Por lo tanto, aquí se puede evidenciar la complejidad de la modulación serotoninérgica del circuito hedónico.

En un contexto obesogénico, se describe el caso de ratas macho Wistar alimentados con HFD por 12 semanas, donde hubo una atenuación en el contenido tisular de 5-HT en hipotálamo y un aumento en el hipocampo en relación a ratas controles (Haleem and Mahmood, 2021). Del mismo modo, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que en machos alimentados con HFD hay menor contenido de 5-HT que en machos alimentados con dieta control, lo que sugiere que 5-HT está modulando el consumo de alimento en ratas macho HFD, esto podría estar sucediendo posiblemente por una mayor motivación mediada por la neurotransmisión dopaminérgica de este núcleo.

En el caso de SL, la serotonina tiene un efecto hiperpolarizante mediado por receptores postsinápticos 5-HT_{1a}, los cuales son expresados altamente en SL (Pompeiano et al., 1992), lo que significa que la serotonina puede inhibir a las neuronas de LS al unirse al receptor postsináptico 5-HT_{1A}. Por lo tanto, los altos niveles de contenido de serotonina encontrados en ratas macho y hembras HFD en SL, se podrían deber posiblemente al efecto de una dieta alta en grasa, estimulando la síntesis directamente en SL o liberando serotonina desde el núcleo del raphe. En consecuencia, la inhibición de SL podría producir que en HL o centro del hambre se active, y se produzca la acción de comer, debido a que SL en una situación control está inhibiendo a HL, del mismo modo que un freno que genera saciedad. Los mecanismos de cómo se genera este aumento de serotonina en SL es el siguiente paso a dilucidar.

11. CONCLUSIONES

En síntesis, podemos concluir lo siguiente:

Las ratas hembras alimentadas con HFD crónica presentan una menor preferencia por sacarosa al 10% que ratas hembras controles durante los cuatro días de medición, resultados contrarios a los machos, los cuales los primeros tres días del test tienen un consumo similar de sacarosa del 10%, ya sea en animales alimentados con HFD o control, únicamente se observaron diferencias en el consumo el último de medición, en donde machos HFD eligen mayoritariamente sacarosa del 10%. Esta diferencia plantea la necesidad de investigar con mayor detalle estas diferencias sexuales, las cuales pueden ser claves a la hora de comprender la obesidad y sus posibles tratamientos.

El contenido tisular de DA en NAcc es mayor en machos alimentados con HFD y controles, que en hembras HFD y control respectivamente, debido al comportamiento motivado mediado por VTA que proyecta neuronas dopaminérgicas hacia NAcc, lo que demuestra que la dieta alta en grasa produce mayor motivación en machos y hembras HFD. Los resultados de DA en SL muestran que los machos HFD presentaron menor contenido de DA que en machos controles, esto podría deberse a que la dieta alta en grasa produce menor síntesis y liberación de DA desde VTA hacia SL, lo cual inhibe a SL y este a su vez deja de inhibir a HL, y se activa el centro del hambre.

Los resultados encontrados en relación al contenido tisular de GABA en SL, muestran que las hembras HFD presentan una menor cantidad de este neurotransmisor en relación a las hembras alimentadas con dieta control, lo cual podría estar incidiendo en la activación de HL como centro del hambre constatado en su aumento de peso, en relación al grupo control.

El contenido tisular de 5-HT en SL fueron sorprendidos, los niveles en machos y hembras HFD son contundentemente altos en relación a sus controles, lo cual podría estar produciendo una inhibición de neuronas de SL lo que tiene como consecuencia un aumento en la activación de HL y por ende el hambre, produciendo un mayor aumento de peso en estos animales.

El control de la alimentación en un estado obesogénico está mediado por un sin número de moléculas que median respuestas entre lo hedónico y homeostático, donde la neuroquímica se ve afectada produciendo posiblemente cambios conductuales que nos llevan a elegir alimentos obesogénicos. Lo más interesante que pudo ser observado en esta tesis, fue la respuesta diferencial entre hembras y machos, mostrándonos una vez más la importancia de experimentar con ambos sexos biológicos con el fin de comprender posibles

diferencias sexuales a la hora de abordar y tratar la temática de la obesidad. Sin embargo, hace falta completar con datos sobre biología molecular que permita tener una imagen más completa de los fenómenos que pueden estar ocurriendo en un cerebro obeso.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Al Massadi, O., Nogueiras, R., Dieguez, C., and Girault, J.A. (2019). Ghrelin and food reward. *Neuropharmacology* 148, 131-138.
- Assaf, S.Y., and Miller, J.J. (1977). Excitatory action of the mesolimbic dopamine system on septal neurones. *Brain Res* 129, 353-360.
- Aston-Jones, G., and Cohen, J.D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci* 28, 403-450.
- Bassareo, V., & Di Chiara, G. (1999). "Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments. *Neuroscience*".).
- Bassareo, V., and Di Chiara, G. (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci* 17, 851-861.
- Becker, J.B., Molenda, H., and Hummer, D.L. (2001). Gender differences in the behavioral responses to cocaine and amphetamine. Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse. *Ann N Y Acad Sci* 937, 172-187.
- Berthoud, H.R. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* 21, 888-896.
- Berthoud, H.R., and Münzberg, H. (2011). The lateral hypothalamus as integrator of metabolic and environmental needs: from electrical self-stimulation to opto-genetics. *Physiol Behav* 104, 29-39.
- Burton, A.C., Nakamura, K., and Roesch, M.R. (2015). From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiol Learn Mem* 117, 51-59.
- Carnes, K.M., Fuller, T.A., and Price, J.L. (1990). Sources of presumptive glutamatergic/aspartatergic afferents to the magnocellular basal forebrain in the rat. *J Comp Neurol* 302, 824-852.
- Chile © Ministerio De Salud, G.D.C. (2019). "ESTUDIOS DE LA OCDE SOBRE SALUD PÚBLICA:". (Chile).
- Clissold, K.A., Choi, E., and Pratt, W.E. (2013). Serotonin 1A, 1B, and 7 receptors of the rat medial nucleus accumbens differentially regulate feeding, water intake, and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 112, 96-103.
- Delgado, J.M., and Anand, B.K. (1953). Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol* 172, 162-168.
- Departamento De Epidemiología División De Planificación Sanitaria Subsecretaría De Salud Pública, S. (noviembre 2017). "Encuesta de salud 2016-2017", (ed.) G.D.C. Ministerio De Salud.).
- Di Chiara, G., and Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5274-5278.
- Egecioglu, E., Skibicka, K.P., Hansson, C., Alvarez-Crespo, M., Friberg, P.A., Jerlhag, E., Engel, J.A., and Dickson, S.L. (2011). Hedonic and incentive signals for body weight control. *Rev Endocr Metab Disord* 12, 141-151.
- España, R.A., Oleson, E.B., Locke, J.L., Brookshire, B.R., Roberts, D.C., and Jones, S.R. (2010). The hypocretin-orexin system regulates cocaine self-administration via actions on the mesolimbic dopamine system. *Eur J Neurosci* 31, 336-348.
- Esposito, R.U., Porrino, L.J., Seeger, T.F., Crane, A.M., Everist, H.D., and Pert, A. (1984). Changes in local cerebral glucose utilization during rewarding brain stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 635-639.
- Fam, J., Clemens, K.J., Westbrook, R.F., Morris, M.J., and Kendig, M.D. (2022). Chronic exposure to cafeteria-style diet in rats alters sweet taste preference and reduces motivation for, but not 'liking' of sucrose. *Appetite* 168, 105742.
- Fletcher, P.J., Azampanah, A., and Korth, K.M. (2002). Activation of 5-HT(1B) receptors in the nucleus accumbens reduces self-administration of amphetamine on a progressive ratio schedule. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 717-725.

- Gardner, E.L. (2011). Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med* 30, 22-60.
- Gaspar, P., Berger, B., Alvarez, C., Vigny, A., and Henry, J.P. (1985). Catecholaminergic innervation of the septal area in man: immunocytochemical study using TH and DBH antibodies. *J Comp Neurol* 241, 12-33.
- Ginebra, O.M.D.L.S. (2019). "Informe sobre los resultados de la OMS: presupuesto por programas 2018-2019: examen de mitad de periodo.", (ed.) Asamblea Mundial De La Salud.).
- Gong, Y., Xu, L., Guo, F., Pang, M., Shi, Z., Gao, S., and Sun, X. (2014). Effects of ghrelin on gastric distension sensitive neurons and gastric motility in the lateral septum and arcuate nucleus regulation. *J Gastroenterol* 49, 219-230.
- Gong, Y., Xu, L., Wang, H., Guo, F., Sun, X., and Gao, S. (2013). Involvements of the lateral hypothalamic area in gastric motility and its regulation by the lateral septum. *Gen Comp Endocrinol* 194, 275-285.
- Gysling, K., and Wang, R.Y. (1983). Morphine-induced activation of A10 dopamine neurons in the rat. *Brain Res* 277, 119-127.
- Haleem, D.J., and Mahmood, K. (2021). Brain serotonin in high-fat diet-induced weight gain, anxiety and spatial memory in rats. *Nutr Neurosci* 24, 226-235.
- Jakab, R.L., and Leranath, C. (1990a). Catecholaminergic, GABAergic, and hippocamposeptal innervation of GABAergic "somatospiny" neurons in the rat lateral septal area. *J Comp Neurol* 302, 305-321.
- Jakab, R.L., and Leranath, C. (1990b). Somatospiny neurons in the rat lateral septal area are synaptic targets of hippocamposeptal fibers: a combined EM/Golgi and degeneration study. *Synapse* 6, 10-22.
- Jean, A., Conductier, G., Manrique, C., Bouras, C., Berta, P., Hen, R., Charnay, Y., Bockaert, J., and Compan, V. (2007). Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16335-16340.
- Johnson, S.W., and North, R.A. (1992). Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci* 12, 483-488.
- Kain, J.U., R., Lera, L., Taibo, M., and Espejo, F.A., C. 2005. Evolution of the nutritional status of six years old Chilean children (1987-2003). . *Rev. Med* [Online].
- Kalivas, P.W., Peters, J., and Knackstedt, L. (2006). Animal models and brain circuits in drug addiction. *Mol Interv* 6, 339-344.
- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., and Drent, M.L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes Rev* 8, 21-34.
- Lee, P.C., and Dixon, J.B. (2017). Food for Thought: Reward Mechanisms and Hedonic Overeating in Obesity. *Curr Obes Rep* 6, 353-361.
- Lizarbe, B., Soares, A.F., Larsson, S., and Duarte, J.M.N. (2018). Neurochemical Modifications in the Hippocampus, Cortex and Hypothalamus of Mice Exposed to Long-Term High-Fat Diet. *Front Neurosci* 12, 985.
- Luo, A.H., Tahsili-Fahadan, P., Wise, R.A., Lupica, C.R., and Aston-Jones, G. (2011). Linking context with reward: a functional circuit from hippocampal CA3 to ventral tegmental area. *Science* 333, 353-357.
- Mickelsen, L.E., Bolisetty, M., Chimileski, B.R., Fujita, A., Beltrami, E.J., Costanzo, J.T., Naparstek, J.R., Robson, P., and Jackson, A.C. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of the lateral hypothalamic area reveals molecularly distinct populations of inhibitory and excitatory neurons. *Nat Neurosci* 22, 642-656.
- Mitra, A., Lenglos, C., and Timofeeva, E. (2015). Inhibition in the lateral septum increases sucrose intake and decreases anorectic effects of stress. *Eur J Neurosci* 41, 420-433.
- Moreno, M. (2012). DEFINITION AND CLASSIFICATION OF OBESITY. 124-128.
- Olds, J., and Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47, 419-427.
- Owesson-White, C., Belle, A.M., Herr, N.R., Peele, J.L., Gowrishankar, P., Carelli, R.M., and Wightman, R.M. (2016). Cue-Evoked Dopamine Release Rapidly Modulates D2 Neurons in the Nucleus Accumbens During Motivated Behavior. *J Neurosci* 36, 6011-6021.

- Palkovits M, V.C.H. (1980). "Quantitative light and electron microscopic studies on the lateral hypothalamus in rat. Cell and synaptic densities". (*Brain Res Bull*).
- Pfaus, J.G., Damsma, G., Nomikos, G.G., Wenkstern, D.G., Blaha, C.D., Phillips, A.G., and Fibiger, H.C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Res* 530, 345-348.
- Pompeiano, M., Palacios, J.M., and Mengod, G. (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12, 440-453.
- Pratt, W.E., Lin, P., Pierce-Messick, Z., Ilesanmi, A.O., and Clissold, K.A. (2017). Contrasting effects of 5-HT. *Behav Brain Res* 323, 15-23.
- Pratt, W.E., Schall, M.A., and Choi, E. (2012). Selective serotonin receptor stimulation of the medial nucleus accumbens differentially affects appetitive motivation for food on a progressive ratio schedule of reinforcement. *Neurosci Lett* 511, 84-88.
- Sandoval-Salazar, C., Ramírez-Emiliano, J., Trejo-Bahena, A., Oviedo-Solís, C.I., and Solís-Ortiz, M.S. (2016). A high-fat diet decreases GABA concentration in the frontal cortex and hippocampus of rats. *Biol Res* 49, 15.
- Scopinho, A.A., Resstel, L.B., and Corrêa, F.M. (2008). alpha(1)-Adrenoceptors in the lateral septal area modulate food intake behaviour in rats. *Br J Pharmacol* 155, 752-756.
- Seong, J., Kang, J.Y., Sun, J.S., and Kim, K.W. (2019). Hypothalamic inflammation and obesity: a mechanistic review. *Arch Pharm Res* 42, 383-392.
- Sheehan, T.P., Chambers, R.A., and Russell, D.S. (2004). Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev* 46, 71-117.
- Sotomayor-Zárate, R., Araya, K.A., Pereira, P., Blanco, E., Quiroz, G., Pozo, S., Carreño, P., Andrés, M.E., Forray, M.I., and Gysling, K. (2010). Activation of GABA-B receptors induced by systemic amphetamine abolishes dopamine release in the rat lateral septum. *J Neurochem* 114, 1678-1686.
- Sotomayor-Zarate, R., Jara, P., Araos, P., Vinet, R., Quiroz, G., Renard, G.M., Espinosa, P., Hurtado-Guzman, C., Moya, P.R., Iturriaga-Vasquez, P., Gysling, K., and Reyes-Parada, M. (2014). Improving amphetamine therapeutic selectivity: N,N-dimethyl-MTA has dopaminergic effects and does not produce aortic contraction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114, 395-399.
- Sotomayor, R., Forray, M.I., and Gysling, K. (2005). Acute morphine administration increases extracellular DA levels in the rat lateral septum by decreasing the GABAergic inhibitory tone in the ventral tegmental area. *J Neurosci Res* 81, 132-139.
- Stanley, B.G., Urstadt, K.R., Charles, J.R., and Kee, T. (2011). Glutamate and GABA in lateral hypothalamic mechanisms controlling food intake. *Physiol Behav* 104, 40-46.
- Stuber, G.D. (2012). Food for thought: attenuation of dopamine signaling by insulin (commentary on Mebel et al.). *Eur J Neurosci* 36, 2335.
- Stuber, G.D., and Wise, R.A. (2016). Lateral hypothalamic circuits for feeding and reward. *Nat Neurosci* 19, 198-205.
- Swanson, L.W., and Cowan, W.M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172, 49-84.
- Swanson, L.W., and Cowan, W.M. (1979). The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol* 186, 621-655.
- Sweeney, P., and Yang, Y. (2015). An excitatory ventral hippocampus to lateral septum circuit that suppresses feeding. *Nat Commun* 6, 10188.
- Sweeney, P., and Yang, Y. (2016). An Inhibitory Septum to Lateral Hypothalamus Circuit That Suppresses Feeding. *J Neurosci* 36, 11185-11195.
- Vega-Quiroga, I., Yarur, H.E., and Gysling, K. (2018). Lateral septum stimulation disinhibits dopaminergic neurons in the antero-ventral region of the ventral tegmental area: Role of GABA-A alpha 1 receptors. *Neuropharmacology* 128, 76-85.
- Volkow, N.D., Wise, R.A., and Baler, R. (2017). The dopamine motive system: implications for drug and food addiction. *Nat Rev Neurosci* 18, 741-752.