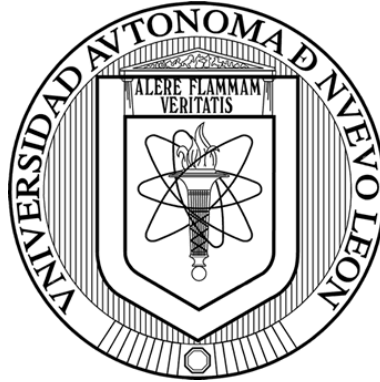


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO EN LA
RESPUESTA METABÓLICA A LA DIETA CETOGENICA
EN RATONES BALB/C BAJO ESTRÉS CRÓNICO**

Por

M. C. ANA LUISA CANTÚ RUIZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2026

PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO EN LA
RESPUESTA METABÓLICA A LA DIETA CETOGÉNICA
EN RATONES BALB/C BAJO ESTRÉS CRÓNICO

Comité de tesis

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández
Presidente

Cristina Rodríguez Padilla

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Ana Carolina Martínez Torres

Dra. Ana Carolina Martínez Torres
1er Vocal

Ricardo Gómez Flores

Dr. Ricardo Gómez Flores
2do Vocal

Patricia Tamez Guerra

Dra. Patricia Tamez Guerra
3er Vocal

Katiushka Arevalo Niño

Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

PAPEL DEL SISTEMA NERVIOSO ADRENÉRGICO EN LA
RESPUESTA METABÓLICA A LA DIETA CETOGÉNICA
EN RATONES BALB/C BAJO ESTRÉS CRÓNICO

Dirección de tesis

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández
Director

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios doctorales en el Laboratorio de Inmunología y Virología, y poder llevar a cabo este proyecto de investigación.

A mi comité de tesis: la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, la Dra. Patricia Tamez Guerra y el Dr. Ricardo Gómez Flores por sus sugerencias, ideas y comentarios enriquecedores durante el desarrollo de este trabajo.

Me gustaría agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Diana Caballero Hernández, por permitirme ser parte de su laboratorio. Por ser parte fundamental en el desarrollo de este proyecto, por apoyarme y guiarme siempre que fuera necesario. Gracias por brindarme su confianza y sus consejos, Dra.

Finalmente agradezco al CONAHCyT por el apoyo otorgado durante mis estudios de doctorado.

DEDICATORIA

A mis padres, por acompañarme durante el transcurso de este proyecto. Por apoyarme y darme palabras de aliento cuando las cosas se ponían complicadas, por escucharme a pesar de no entenderme en muchas ocasiones. Gracias por siempre estar. A mis hermanos: Daniel, por darme consejos acerca de las presentaciones y escucharme cuando lo necesitaba. Aimee, gracias por siempre estar para mí, por acompañarnos mutuamente cuando teníamos nuestros pendientes, por escucharme cuando quería ensayar para las presentaciones y por alentarme cuando lo necesitaba. También a morita, gracias por ser mi acompañante de desvelos durante toda mi carrera profesional.

Isaías, gracias por ser mi compañero a lo largo de estos años, por los consejos y motivaciones día con día, tanto a nivel personal como profesional, por ser parte del desarrollo de este proyecto, ayudándome en todo lo que fuera necesario. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Diana Caballero, por confiar en mi desde licenciatura, por permitirme ser parte de su laboratorio durante todos estos años. Gracias infinitas por sus consejos, sus pláticas, por compartir su experiencia y conocimiento a lo largo de todo este camino. Ha sido parte fundamental de mi desarrollo profesional. Muchas gracias, Dra.

A mis compañeros de generación, gracias por las pláticas y los consejos a lo largo de estos años.

A mis compañeros de laboratorio. Si bien algunos de ellos solo estuvieron poco tiempo, fueron parte importante del desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIA	6
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES	2
Estrés crónico.....	4
Dieta cetogénica, regulación adrenérgica y su impacto en el estrés.....	5
JUSTIFICACIÓN.....	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIAL Y MÉTODOS	11
Animales	11
Diseño experimental.....	11
Protocolo de estrés crónico	12
Administración de la dieta cetogénica.....	12
Monitoreo del peso corporal e IMC	14
Monitoreo de ingesta de alimento	14
Monitoreo de ingesta de agua.....	14
Cuantificación de cuerpos cetónicos	14
Tratamiento con el antagonista adrenérgico β_1 y β_2 , propanolol	14
Tratamiento con el antagonista adrenérgico β_3 , L748337	14
Prueba postprandial	15
Análisis metabólico.....	15
Análisis estadístico	15
RESULTADOS.....	17
1. Efecto de la dieta cetogénica en alteraciones morfométricas y metabólicas en ratones BALB/c bajo estrés crónico.	17
1.1. La dieta cetogénica altera los niveles de cuerpos cetónicos circulantes en condiciones de estrés crónico de manera diferencial por sexo.....	17
1.2. La dieta cetogénica altera el peso corporal, pero no el IMC de manera diferencial por sexo.	18
1.3. La dieta cetogénica causa alteraciones en el tejido adiposo de manera diferencial por sexo.....	19

1.4.	La dieta cetogénica altera la conducta alimentaria en ratones BALB/c bajo restricción de movilidad de manera diferencial por sexo.....	20
1.5.	La dieta cetogénica altera la tolerancia a la glucosa en ratones BALB/c bajo restricción de movilidad.....	22
2.	Papel del sistema nervioso adrenérgico beta-2 en las alteraciones morfométricas y metabólicas en respuesta a la dieta cetogénica en ratones BALB/c bajo estrés crónico.....	23
2.3.	El sistema nervioso adrenérgico beta-2 está involucrado en la formación de cuerpos cetónicos circulantes de manera diferencial por sexo en ratones con KD.....	23
2.4.	Los efectos de la dieta cetogénica son regulados por el receptor adrenérgico beta-2 en machos.....	24
2.5.	Los efectos de la dieta cetogénica sobre los depósitos de tejido adiposo no son regulados por el sistema nervioso adrenérgico beta-2.	25
2.6.	El sistema nervioso adrenérgico beta-2 está involucrado en la regulación de la conducta alimentaria al consumir dieta cetogénica.....	26
2.7.	Los efectos de la dieta cetogénica sobre la tolerancia a la glucosa no se ven alterados al utilizar un antagonista de receptores beta adrenérgico.	28
3.	Papel del sistema nervioso adrenérgico beta-3 en las alteraciones morfométricas y metabólicas en respuesta a la dieta cetogénica en ratones BALB/c bajo estrés crónico.....	29
3.1	El sistema nervioso adrenérgico beta-3 se encuentra involucrado en los efectos del estrés crónico sobre la formación de cuerpos cetónicos de manera diferencial por sexo en ratones con KD.	29
3.2	El sistema nervioso adrenérgico β -3 juega un papel en el mantenimiento de peso corporal en ratones macho bajo consumo de KD, mientras que en hembras potencia la pérdida de peso observada bajo estrés crónico.	30
3.3	La ganancia de adiposidad observada en ratones que consumen dieta cetogénica no es mediada por la señalización adrenérgica β -3.....	31
3.4	El sistema nervioso adrenérgico b-3 no está involucrado en los efectos observados en ingesta de alimento y agua de manera dependiente de sexo.	32
3.5	La menor tolerancia a la glucosa observada en ratones con dieta cetogénica es modulada por el receptor adrenérgico b-3 en machos, pero no en hembras.	34
4.	Determinar el efecto del estrés crónico y la dieta cetogénica sobre el metaboloma de ratones hembra de la cepa BALB/c.....	35
	DISCUSIÓN	40
	CONCLUSIONES	46
	PERSPECTIVAS	47
	REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Efecto de la dieta cetogénica sobre los niveles de b-hidroxibutirato en un modelo murino bajo condiciones de estrés crónico y reposo	17
2	Evaluación del aumento de peso corporal durante los 23 días del protocolo	18
3	Evaluación del tejido adiposo interscapular, inguinal y visceral al día 23 de estrés por restricción de movimiento, dieta cetogénica o su combinación	20
4	Efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico	21
5	Efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico	21
6	Efecto de la dieta cetogénica, el estrés crónico y su combinación en ratones BALB/c el día 23 del protocolo	22
7	Efecto del antagonismo de receptores beta-adrenérgico sobre los efectos de la dieta cetogénica en los niveles de b-hidroxibutirato en un modelo murino bajo condiciones de estrés crónico y reposo	24
8	Efecto del antagonismo de receptores beta-adrenérgico sobre los efectos de la dieta cetogénica en la ganancia de peso corporal e IMC en ratones bajo condiciones de estrés crónico y reposo	25
9	Efecto del antagonismo de receptores adrenérgicos beta en el tejido adiposo interscapular, inguinal y visceral al día 23 de estrés por restricción de movimiento, dieta cetogénica o su combinación	26
10	Efecto del antagonista de receptores adrenérgicos beta sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico	27
11	Efecto del antagonista de receptores adrenérgicos beta sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico	28
12	Efecto del antagonista de receptores adrenérgicos beta sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho bajo estrés crónico	29
13	Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre los efectos de la dieta cetogénica en los niveles de □-hidroxibutirato en un modelo murino bajo condiciones de estrés crónico y reposo	30
14	Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre los efectos de la dieta cetogénica en la ganancia de peso corporal e IMC en ratones bajo condiciones de estrés crónico y reposo.	31
15	Efecto del antagonismo de receptores adrenérgicos beta en el tejido adiposo interscapular, inguinal y visceral al día 23 de estrés por restricción de movimiento, dieta cetogénica o su combinación.	32
16	Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico.	33
17	Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 a sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones hembra bajo estrés crónico.	33
18	Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho bajo estrés crónico.	34
19	Análisis de varianza (ANOVA) de los metabolitos identificados en plasma de ratones hembra BALB/c bajo estrés crónico, dieta	35

	cetogénica o reposo.	
20	Metabolitos identificados a partir de la prueba post hoc Fisher LSD.	36
21	Análisis PLS-DA de muestras de plasma de hembras de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y/o dieta cetogénica.	37
22	Análisis PLS-DA de muestras de plasma de hembras de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y/o dieta cetogénica.	37
23	Gráfico de valores VIP de muestras de plasma de ratones hembra de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y dieta cetogénica. De forma vertical se encuentran los principales metabolitos, mientras de forma horizontal los valores VIP.	39
24	Heatmap de los metabolitos plasmáticos significativamente alterados en muestras de plasma de ratones hembra BALB/c bajo estrés crónico y/o dieta cetogénica.	39

RESUMEN

La dieta cetogénica (KD) es una dieta alta en grasas y baja en carbohidratos cuya ingesta ocasiona ajustes metabólicos que conducen a la pérdida de peso corporal en los individuos. También se le atribuyen también propiedades neuroprotectoras, aunque los mecanismos mediadores no han sido esclarecidos del todo. Diversos autores han reportado que los efectos de la dieta KD sobre el metabolismo son mediados por el sistema nervioso adrenérgico, lo cual podría abrir un panorama para el estudio del papel de la señalización adrenérgica en las interacciones entre la dieta y metabolismo bajo condiciones de normalidad y patológicas. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de una dieta cetogénica sobre la respuesta metabólica en condiciones de estrés crónico. Se utilizó como modelo el ratón BALB/c, el cual según estudios realizados en nuestro laboratorio presenta alteraciones en el metabolismo de la glucosa ligadas a la ausencia de IL-6 circulante en respuesta a la inducción de estrés, de manera dependiente de sexo. Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* donde los animales recibieron dieta normal y cetogénica, sometiéndose además a un protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento. Se utilizó el bloqueo farmacológico de receptores beta-adrenérgicos para estudiar el papel de la señalización adrenérgica en los efectos observados, evaluándose, además, indicadores de metabolismo, peso y composición corporal. Finalmente se realizó un análisis metabolómico en plasma de hembras bajo las condiciones descritas anteriormente. Los resultados indican que la dieta cetogénica induce alteraciones metabólicas, morfométricas y de conducta alimentaria, en ambos sexos. Por otra parte, el estrés crónico atenúa el incremento de peso corporal y los niveles plasmáticos de BHB en hembras que consumieron KD. También se demostró que el sistema nervioso beta-adrenérgico regula el incremento de adiposidad y niveles de BHB, observados al someter a las hembras bajo estrés crónico, con dieta cetogénica como régimen alimenticio. De igual forma, el sistema nervioso adrenérgico media los cambios morfométricos observados en machos que consumieron KD. Finalmente se demostró que el consumo de la dieta cetogénica altera el perfil metabolómico plasmático, en hembras, independientemente del estrés crónico. Estos resultados sugieren una interacción entre el estrés crónico y una dieta cetogénica alta en grasas que modifica sus efectos de manera dependiente del sexo, así como el papel del sistema nervioso adrenérgico en los efectos observados.

ABSTRACT

The ketogenic diet (KD) is a high-fat, low-carbohydrate diet whose intake induces metabolic adjustments that lead to body weight loss in individuals. It has also been attributed to neuroprotective properties; however, the mediating mechanisms have not yet been fully elucidated. Various authors have reported that the effects of the KD on metabolism are mediated by the adrenergic nervous system, which could open new avenues for studying the role of adrenergic signaling in the interactions between diet and metabolism under both normal and pathological conditions. The aim of this study was to determine the effect of a ketogenic diet on the metabolic response under conditions of chronic stress. The BALB/c mouse was used as a model, which, according to studies conducted in our laboratory, exhibits alterations in glucose metabolism linked to the absence of circulating IL-6 in response to stress induction, in a sex-dependent manner. In vivo experiments were carried out in which animals received either a standard or a ketogenic diet and were additionally subjected to a chronic restraint stress protocol. Pharmacological blockade of beta-adrenergic receptors was used to study the role of adrenergic signaling in the observed effects, while indicators of metabolism, body weight, and body composition were also evaluated. Finally, a plasma metabolomic analysis was performed in females under the previously described conditions. The results indicate that the ketogenic diet induces metabolic, morphometric, and feeding behavior alterations in both sexes. On the other hand, chronic stress attenuates body weight gain and plasma BHB levels in females consuming the KD. It was also demonstrated that the beta-adrenergic nervous system regulates the increase in adiposity and BHB levels observed in females subjected to chronic stress while consuming a ketogenic diet. Similarly, the adrenergic nervous system mediates the morphometric changes observed in males consuming the KD. Finally, it was demonstrated that consumption of the ketogenic diet alters the plasma metabolomic profile in females, independently of chronic stress. These results suggest an interaction between chronic stress and a high-fat ketogenic diet that modifies its effects in a sex-dependent manner, as well as highlighting the role of the adrenergic nervous system in the observed effects.

INTRODUCCIÓN

La dieta cetogénica (KD), utilizada principalmente como tratamiento de enfermedades como epilepsia y diabetes, es una dieta rica en grasas, con un contenido adecuado de proteínas y baja en carbohidratos, que mantiene el organismo en estado cetogénico debido a producción de altos niveles de cuerpos cetónicos. En condiciones como inanición, los cuerpos cetónicos son aprovechados como principal fuente de energía por el organismo. Se ha reportado que la administración de una dieta KD tiene efectos protectores sobre los trastornos del estado de ánimo, así como para evitar la pérdida de peso en ratas sometidas a estrés. Por otra parte, el estrés crónico es considerado como una experiencia emocional negativa, percibida por el sistema nervioso, con la capacidad de alterar la homeostasis del organismo. La desregulación de esta homeostasis debido a la exposición de estresores tiene un papel en el desarrollo de diversas patologías, como infecciones, desequilibrio metabólico, enfermedades neuro-degenerativas, y cáncer. Se sabe que el estrés es capaz de inducir la activación del sistema nervioso, activando la vía simpato-adreno-medular (SAM) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), liberando hormonas mediadoras del estrés, como catecolaminas y glucocorticoides, que en forma crónica afectan la salud de los individuos. También se ha demostrado en modelos murinos que el estrés crónico influye en el metabolismo de glucosa y lípidos, en la modulación del peso corporal y el comportamiento a través de la vía adrenérgica. Recientemente, se ha reportado que el sistema nervioso adrenérgico actúa como mediador de los efectos de la dieta cetogénica en el peso corporal. Los efectos de la KD, como pérdida del peso corporal, son atribuidos a ajustes metabólicos en los que participan los receptores adrenérgicos. Se ha reportado una relación directa entre los cuerpos cetónicos y la regulación del sistema nervioso adrenérgico, controlando el gasto energético corporal para el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Sin embargo, a pesar de lo mencionado anteriormente, la participación del sistema adrenérgico en los efectos de la dieta cetogénica en el organismo no ha sido del todo elucidado. El objetivo del presente proyecto es evaluar el efecto de la dieta cetogénica sobre la modulación adrenérgica y los efectos metabólicos del estrés crónico en el modelo de ratón BALB/c.

ANTECEDENTES

La dieta cetogénica (KD) es una dieta rica en grasas, restringida en carbohidratos, con una restricción <50 gramos al día, con una cantidad adecuada de proteínas. Hablando de proporciones, esta se compone de un 55% a 80% de grasa, 10% a 35% de proteína, y de 5% a 10% de carbohidratos. La composición de esta varía según autores, así como la necesidad del consumidor, considerándose en su mayoría que, en una dieta de 2000 kcal diarias, solamente se consumirían 20–50 g de carbohidratos al día (Massod, Annamaraju P. & Uppaluri KR. 2022).

Los carbohidratos son considerados la principal fuente de producción de energía de los tejidos corporales. Cuando el cuerpo se ve privado de carbohidratos debido a la reducción de la ingesta a menos de 50 g por día, la reducción de insulina se reduce entrando el organismo en un estado catabólico. Posteriormente, las reservas de glucógeno se agotan obligando al cuerpo a experimentar cambios metabólicos. Esto permite la simulación de los efectos metabólicos en un estado de inanición obligando al cuerpo a alejarse de su fuente de energía tradicional, la glucosa, para proceder a utilizar grasas, a través de la gluconeogénesis y la cetogénesis (Masood, 2020).

La gluconeogénesis consiste en la producción endógena de glucosa en el cuerpo, siendo el principal órgano productor el hígado, a partir de ácido láctico, glicerol y los aminoácidos alanina y glutamina. Cuando la disponibilidad de glucosa es menor, la producción endógena de glucosa no es capaz de satisfacer las necesidades del organismo, comenzando así a generar energía alterna, a través de la cetogénesis. De esta manera, el metabolismo se ve obligado a obtener energía a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos que, convertidos en cuerpos cetónicos (Acetoacetato, acetona y β - hidroxibutirato), pueden ser aprovechados por el sistema nervioso central (SNS) así como por las mitocondrias (Davis et al. 2020; Batch, 2020; Masood, 2020). La cetosis, se ha considerado fundamental para la supervivencia del hombre, al proporcionar no glucosa a su cerebro, evitando que el músculo sea destruido para sintetizar glucosa. Esta condición consiste en la elevación de D-beta-hidroxibutirato y acetoacetato, siendo este primer componente un elemento indispensable de los beneficios que la cetosis generan en el organismo (Veech et al. 2001). El estado de “cetosis nutricional”, caracterizado por la presencia de cuerpos

cetónicos debido a la alimentación se considera un estado seguro, ya que dichos cuerpos cetónicos se producen en pequeñas concentraciones sin alterar el pH sanguíneo. Finalmente, los cuerpos cetónicos pueden ser utilizados para la producción de energía en el corazón, tejido muscular y riñones.

Los efectos secundarios comunes de la dieta cetogénica abarcan síntomas que incluyen fatiga, dolor de cabeza, mareos, trauma, náuseas, vómitos, estreñimiento y baja tolerancia al ejercicio. Mientras que, los efectos secundarios a largo plazo involucran esteatosis hepática, cálculos renales, hipoproteinemia y deficiencia de vitaminas, por lo cual es necesario indagar sobre los efectos beneficiosos y perjudiciales en el organismo (Batch, 2020). Nakao y colaboradores (2019) demostraron que, en ratones que consumieron dieta cetogénica por siete días, se observaron alteraciones en el musculo gastrocnemio, tibia y soleo, una vez terminando el protocolo. A nivel molecular, genes implicados con atrofia muscular como Mafbx, Murf1, Foxo3 se encontraban sobrerregulados en comparación con los ratones que consumieron dieta normal; esto indica que la dieta cetogénica podría inducir atrofia muscular a corto plazo. También se ha reportado que ratones C57BL/6 que con dieta cetogénica durante un periodo de 12 semanas permanecen delgados, hipoinsulinémicos y desarrollan intolerancia glucémica a la glucosa, además de esteatosis hepática (Garbow, et al. 2011). La producción corporal de cetonas es dependiente de varios factores, como la tasa metabólica basal en reposo (TMB), el índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal.

Diversos estudios han demostrado los notables beneficios que las dietas cetogénicas brindan en sus consumidores; como la pérdida de peso, el mejoramiento inmunológico, la reducción de hiperinsulinemia, y la mejora de la sensibilidad a la insulina, así como efectos neuroprotectores (Cicero et al. 2015; Yancy et al. 2004). Se ha sugerido además como tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como epilepsia, Alzheimer, Parkinson, diabetes, entre otras. (El-Rashidy, et al. 2013; Wong, 2020). El β - hidroxibutirato, en particular, ha sido objeto de estudio, debido a las propiedades a las que se le atribuye. En el cerebro, se puede atribuir en los astrocitos por oxidación de ácidos grasos o catabolismo de aminoácidos, metabolizándose en la mitocondria de todos los tipos de células cerebrales, siendo la captación a través de la barrera hematoencefálica un punto de control. Tiene un papel inhibitor de las histonas desacetilasas de clase I produciendo una regulación positiva de genes implicados en la protección contra estrés oxidativo y la regulación

del metabolismo (Shimazu, 2013). Por otra parte, Youm y colaboradores (2015) reportaron que el β OHB bloquea la enfermedad inflamatoria mediada por el inflamasoma NLRP3, esto al proporcionar una dieta cetogénica en ratones, estimulando sus macrófagos con LPS y el activador de NLRP3, disminuyendo la activación de caspasa 1 así como la secreción de IL-1 β . En modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson in vivo e in vitro se observa una disminución del perfil inflamatorio, al administrar β OHB y estimulando las células con LPS (Fu et al. 2015).

Estrés crónico

El estrés se asocia con la alteración del sistema inmunológico, teniendo efectos en la salud del individuo como el desarrollo de desórdenes como ansiedad o depresión. Este se considera como una serie de etapas, comenzando con un estímulo estresor, que posteriormente es percibido por el cerebro generando una respuesta en el organismo, ya sea beneficiosa o perjudicial (Dhabhar, 2014). Dichos efectos son mediados según la duración del estresor; el estrés agudo o intermitente, el cual tiene una duración de minutos a horas, puede alterar de manera beneficiosa las respuestas inmunitarias, propiciando una mejor respuesta en el organismo. Por otra parte, el estrés crónico o persistente, con una duración de varias horas al día durante semanas o meses, se ha asociado con los efectos perjudiciales en la salud (Gouin, 2011).

El estrés crónico se define como una experiencia emocional negativa, la cual es acompañada de cambios bioquímicos, fisiológicos, conductuales y cognitivos dirigidos a la adaptación, ya sea manipulando la situación para alterar los efectos del estresor o la desregulación de la homeostasis del individuo (Baum, 1990). La respuesta al estresor varía dependiendo de varios factores como la duración del estresor, el tipo de estrés, el estímulo al que se someta el organismo, las hormonas liberadas en el momento, así como la respuesta al estrés del individuo (Dhabhar, 2014, 1997).

La exposición al estresor induce la activación de dos vías; la vía simpato-adreno-medular (SAM) y el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA). El hipotálamo es crucial en la respuesta al estrés, independientemente del tipo. La liberación de

catecolaminas se lleva a cabo a través de la vía SAM, la cual inicia cuando las neuronas preganglionares simpáticas de la medula adrenal reciben estímulos provenientes del hipotálamo, activando la vía simpática. La activación de las neuronas postganglionares simpáticas produce la liberación de norepinefrina, segregada por la medula suprarrenal, el hipocampo y la corteza cerebral. Mientras tanto, la liberación de las neuronas preganglionares simpáticas activa la medula adrenal de las glándulas adrenales liberando a la circulación epinefrina y, en menor medida, norepinefrina (Stephens & Wand, 2012). Por otra parte, bajo un estímulo estresor más prolongado, es activado el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), responsable de la liberación de glucocorticoides, cuya vía de señalización inicia con la estimulación de las neuronas de la región PVN del hipotálamo liberando el factor liberador de catecolaminas (CRF) y la arginina vasopresina (AVP) en los vasos sanguíneos que conectan el hipotálamo y la glándula pituitaria. Ambas hormonas estimulan la glándula pituitaria produciendo la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) hacia la circulación general. Esta hormona, a su vez, induce la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) de las glándulas suprarrenales, que se encuentran en la parte superior de los riñones (Stephens & Wand, 2012; Kovács et al. 2005). El sistema HPA es modulado a través de retroalimentación negativa con el fin de proteger de la actividad prolongada, manteniendo los niveles hormonales de manera homeostática.

La desregulación de la homeostasis del organismo por el estrés ha sido ampliamente estudiada desde hace varias décadas, generando evidencia de los efectos perjudiciales en la salud del individuo. Entre ellos, se encuentra el desarrollo de diversas patologías como enfermedades crónicas, cáncer, así como la susceptibilidad a infecciones bacterianas o vírales (Zhang, 2020; Peters, 2021).

Dieta cetogénica, regulación adrenérgica y su impacto en el estrés.

El sistema nervioso simpático tiene la capacidad de regular la producción de citocinas teniendo diversos efectos en la funcionalidad de los individuos (Szelényi, 2007). El estrés crónico es capaz de modular la liberación de norepinefrina y catecolaminas, las cuales a través de su interacción con los receptores de glucocorticoides (GR) y los receptores adrenérgicos pueden alterar el funcionamiento de las células del sistema inmune, desde la alteración de la función

de las células inmune hasta la modulación de la secreción de citocinas (Dhabhar, 2014; Slota, 2015). Laukova y colaboradores (2013) demostraron que, en ratas Sprague-Dawley sometidas a estrés por inmovilización los niveles de norepinefrina y corticosterona incrementaron significativamente, disminuyendo la expresión de los receptores β_2 , y α_2C - adrenérgicos, encontrando además un incremento de los niveles de IL-6. Por otra parte, Gupta y colaboradores (2019) reportaron que, los receptores β_1 -adrenérgicos median la elevación de acil-grelina plasmática, alterando consigo el estado de ánimo y la alimentación esto en ratones C57BL/6. Se ha demostrado, además, que la vía β_2 -AR tiene la capacidad de alterar la respuesta inmune innata de ratones tratados con un agonista de receptores adrenérgicos β_2 , teniendo una mayor susceptibilidad a infección por citomegalovirus de ratón, mientras que los ratones deficientes a dicho receptor produjeron niveles altos de citocinas proinflamatorias (Wieduwild et al. 2020). Los receptores de glucocorticoides, así como los receptores adrenérgicos son expresados en una gran variedad de células del sistema inmune, interactuando con el cortisol y la norepinefrina, respectivamente, liberadas en situaciones de estrés, interfiriendo en la producción de NF-kB y regulando la producción de citocinas (Padgett, 2003). De esta manera, existe una relación entre la modulación de regulación adrenérgica por el estrés, teniendo a su vez, el papel de los receptores adrenérgicos en la respuesta inmunológica.

Recientemente se ha reportado que el sistema nervioso adrenérgico actúa como mediador de los efectos de la dieta cetogénica en el metabolismo y en la respuesta inmunológica, sin embargo, son pocos los estudios que se han desarrollado acerca de este tema. Debido a las propiedades neuroprotectoras que se le atribuye al consumo de esta dieta, desde su uso en tratamientos de la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, depresión, esclerosis múltiple y autismo (Tieu, 2003; Murphy, 2004; Davis, 2020) se ha planteado el papel modulador que la dieta cetogénica podría tener en enfermedades crónicas como el estrés.

Sahagun y colaboradores (2019) reportaron que, en ratas Long Evans, sometidas a estrés crónico y consumo de dieta cetogénica se observó una resistencia a la pérdida de peso, característica de los protocolos de estrés crónico, a diferencia de las ratas que consumieron dieta normal, lo que indica una protección de los cuerpos cetónicos contra el estrés crónico. Los efectos de la dieta cetogénica son atribuidos

principalmente a regulaciones metabólicas en los que participan los receptores adrenérgicos, ya que, en ausencia de ellos, hay cambios en el fenotipo que usualmente se observa al consumir dieta KD; por lo cual los receptores adrenérgicos ya sea de manera directa o indirecta están involucrados en la respuesta al estrés (Douris, 2017). Por otro lado, Ryan y colaboradores (2017) reportaron que, el consumo de una dieta rica en grasas activa el eje HPA en ratas y ratones macho, siendo involucrado el factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) importante hormona reguladora del estrés producida durante estrés metabólico, incluyendo la cetosis, sugiriendo que la regulación de esta vía es mediada por el entorno nutricional del individuo.

JUSTIFICACIÓN

La dieta cetogénica (KD) es una dieta rica en grasas y baja en carbohidratos que ha sido objeto de estudio debido a sus efectos en el organismo. Desde la pérdida eficiente de peso, y sus efectos benéficos en enfermedades como epilepsia, Alzheimer, Parkinson, diabetes, etc., que la han convertido en una intervención con potencial terapéutico. Recientemente se ha reportado que la KD contrarresta los efectos del estrés crónico sobre el peso corporal, lo que sugiere la participación del sistema adrenérgico.

Se sabe que el estrés altera considerablemente la salud del individuo: desde el desarrollo de cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes, desregulación inmunológica y depresión. Diversos estudios han demostrado el papel del sistema nervioso simpático en los efectos del estrés, una relación bien establecida, que, sin embargo, aún tiene aspectos por explorar.

Por lo anterior, en este trabajo se determinó el papel de la señalización adrenérgica en los efectos de la dieta cetogénica en individuos bajo estrés crónico.

HIPÓTESIS

El sistema nervioso adrenérgico está involucrado en los ajustes metabólicos en respuesta a la dieta cetogénica en ratones BALB/c bajo condiciones de estrés crónico.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del sistema nervioso adrenérgico en la regulación metabólica por dieta cetogénica en ratones BALB/c bajo estrés crónico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la dieta cetogénica sobre parámetros de composición corporal y metabolismo postprandial del ratón BALB/c.
2. Evaluar el efecto de la dieta cetogénica sobre parámetros de composición corporal y metabolismo postprandial del ratón BALB/c bajo estrés crónico.
3. Determinar la participación del sistema nervioso adrenérgico en los efectos del estrés y la dieta cetogénica sobre parámetros de composición corporal y metabolismo postprandial del ratón BALB/c.
4. Determinar el efecto del estrés crónico y la dieta cetogénica sobre el metaboloma de ratones hembra de la cepa BALB/c.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, de ambos sexos, de 12 - 16 semanas de edad, estos fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Estos se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (6 A.M. – 6 P.M.), a una temperatura ambiental controlada de 22 °C y humedad relativa de 45%. Todos los procedimientos de trabajo fueron sometidos por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEIBA) del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, cuyo registro es CEIBA-2021-002.

Diseño experimental

Para llevar a cabo los experimentos, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en función del sexo, realizándose experimentos independientes, *in vivo* y *ex vivo* con cada una de las variables señaladas a continuación:

Experimento 1: Efecto de la dieta cetogénica (KD)

MACHOS

1. Dieta estándar (n=5)
2. KD (n=5)

HEMBRAS

3. Dieta estándar (n=5)
4. KD (n=5)

Experimento 2: Efecto de la dieta cetogénica bajo estrés crónico

MACHOS

Estrés + dieta estándar (n=5)

Estrés + KD (n=5)

HEMBRAS

Estrés + dieta estándar (n=9)

Estrés + KD (n=5)

Experimento 3: Participación del sistema adrenérgico

MACHOS

Bloqueo adrenérgico beta-2

PRO (n=5)

Estrés + PRO (n=5)

Estrés + KD + PRO (n=5)

Bloqueo adrenérgico beta-3

L748337 (n=5)

L748337 + KD (n=5)

L748337 + estrés + KD (n=5)

HEMBRAS

Bloqueo adrenérgico beta-2

Hembras PRO (n=5)

Hembras + estrés + PRO (n=5)

Hembras + estrés + KD + PRO (n=5)

Bloqueo adrenérgico beta-3

Hembras L748337 (n=5)

Hembras L748337 + KD (n=5)

Hembras L748337 + estrés +KD (n=5)

Protocolo de estrés crónico

Los animales de todos los grupos experimentales se sometieron a un proceso de aclimatación de una semana, donde fueron manipulados diariamente por un mismo operador. El protocolo consistió en un paradigma de estrés crónico por restricción del movimiento, por un periodo de 23 días, durante 4 horas diarias, de lunes a domingo, con descansos establecidos. Para ello, los ratones se colocaron en forma individual en un tubo cónico de 50 mL bien ventilado, donde no tuvieran la posibilidad de moverse libremente hacia adelante o hacia atrás. El procedimiento se repitió durante los siguientes 22 días de experimentación. Los animales control permanecieron en sus jaulas sin ninguna perturbación a su ambiente, más que el monitoreo de los ratones. La inducción se realizó en un horario de 11:00 A.M. a 3 P.M.

Administración de la dieta cetogénica

Se emplearon ratones BALB/c de ambos sexos y se dividieron en dos grupos en función del sexo y tipo de dieta: cetogénica (KD) y control (C). La dieta cetogénica consistió en alimento con una composición de 80% de grasa, 15% de

proteína y 5% carbohidratos (Research Diets: D06040601) mientras que la dieta estándar corresponde al alimento para roedor proporcionado por el laboratorio (LabDiet 5001) con una composición de un 16% de grasa, 26% de proteína y 56% de carbohidratos, durante 23 días. La disponibilidad de alimento y agua se realizó de manera *ad libitum*.

Periodo de transición de la dieta cetogénica

Con el fin de evitar efectos secundarios como deshidratación, diarrea, pérdida de peso severa por el cambio de la dieta administrada en los grupos con dieta cetogénica, sometimos a los ratones a un periodo de transición de 10 días.

La transición de la dieta cetogénica fue realizada basándose en el consumo de alimento estándar diario de cada uno de los animales. Posteriormente, se calculó el aporte calórico de la cantidad consumida, tomándose ese valor para calcular la cantidad de alimento cetogénico requerido para que los ratones consumieran la misma cantidad de calorías que consumían previo a la transición de la dieta.

La cantidad de alimento a colocar diariamente se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Ingesta energética (Kcal)} = \text{alimento estándar promedio consumido (g)} * 2.86 \text{ (Kcal/g)}$$

Una vez determinada la ingesta energética, se calculó la cantidad de alimento estándar que aportaba el 75% de las calorías que se colocarían los primeros tres días de la transición, de la siguiente manera:

$$\text{Alimento estándar (g)} = \text{Ingesta energética (Kcal)} * 0.75 / 2.86 \text{ (Kcal)}$$

Por otra parte, para calcular la cantidad de alimento cetogénico requerido para administrar el 25%, se obtuvieron los cálculos de la siguiente manera:

$$\text{Alimento cetogénica (g)} = \text{Ingesta energética (Kcal)} * 0.75 / 6.1 \text{ (Kcal)}$$

Una vez pasados los tres días, se colocó el 50% de dieta estándar y un 50% de dieta cetogénica, obteniéndose los valores de la misma forma que la descrita anteriormente. Posteriormente, se cambiaron los porcentajes de alimento, un 25% de dieta estándar y un 75% de dieta cetogénica, por los siguientes tres días.

Finalmente, al día diez se colocó un 100% de alimento cetogénico, administrando de manera *ad libitum* por los siguientes 23 días.

Monitoreo del peso corporal e IMC

Se determinó el peso del ratón cada 3 días hasta finalizar el protocolo experimental, utilizando una balanza digital. El IMC se obtuvo dividiendo el peso del animal entre el cuadrado de la longitud ano-nasal (Friedman *et al.* 1991).

Monitoreo de ingesta de alimento

Se monitoreó el consumo de alimento en gramos, utilizando una balanza digital, los días 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 del experimento. Finalmente, se dividió la cantidad de alimento consumida entre el número de individuos para obtener la cantidad de alimento consumido por ratón.

Monitoreo de ingesta de agua

Se monitoreó el consumo de agua los días 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 utilizando una probeta de 100 mL. Finalmente, se dividió la cantidad de agua consumida entre la cantidad de ratones para obtener la cantidad de agua consumida por ratón.

Cuantificación de cuerpos cetónicos

Una vez finalizado el protocolo se evaluó el estado de cetosis midiendo la concentración de cuerpos cetónicos, específicamente β -hidroxibutirato (BHB) en sangre. Se colectó la sangre de la cola de los ratones una vez finalizado el protocolo, dicha medición fue realizada inmediatamente después de coleccionar la sangre usando tiras reactivas para cetonas marca KetoSensTM (i-SENS, Seoul, Corea).

Tratamiento con el antagonista adrenérgico β_1 y β_2 , propanolol

El antagonista adrenérgico propanolol se administró diariamente a una dosis de 10 mg/kg por vía intraperitoneal, durante todo el experimento.

Tratamiento con el antagonista adrenérgico β_3 , L748337

El antagonista adrenérgico L748337 se administró diariamente a una dosis de 100 μ g/kg por vía intraperitoneal, a lo largo del protocolo.

Prueba postprandial

Los ratones se mantuvieron en ayuno durante un periodo de 6 horas con la finalidad de realizar una prueba de tolerancia de glucosa, conocida como prueba postprandial. Se realizó una determinación de glucosa en sangre mediante un glucómetro (TrueMetrix, Trividia Health, Florida, EE. UU), considerándose como el tiempo 0, inmediatamente después se administró a los animales, una solución de glucosa 100 mg/mL (ICN Biomedicals, Ohio, EE. UU), 0.1 mL por cada 10 gramos de peso del animal, mediante inyección en la cavidad intraperitoneal, realizando determinaciones de glucosa a los 15, 30, 60 y 120 min. Para obtener la sangre, se cortaron 1–2 mm de tejido de la punta de la cola en la parte distal al hueso con tijeras 2 h antes de obtener la primera muestra de prueba. La sangre se obtuvo masajeando suavemente la cola y colocando la gota de sangre en las tiras reactivas. Las muestras subsiguientes se obtuvieron retirando suavemente la costra y repitiendo el masaje.

Análisis metabólico

Se mandaron a analizar 80 μ L de suero plasmático de ratones hembra bajo las siguientes condiciones: 1) reposo, 2) estrés crónico, 3) dieta cetogénica y 4) dieta cetogénica + estrés, para la medición de perfiles metabólicos en el Centro de Innovación Metabólica (TMIC). El análisis se realizó a partir del método TMIC MEGA assay, siguiendo los protocolos y las condiciones establecidas por el TMIC.

Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como promedio \pm SE. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Graphad Prism 8. Ingesta de agua, alimento, IMC, cuerpos cetónicos, AUC y porcentaje de grasa corporal fueron primero analizados por ANOVA de una vía, seguido por comparaciones múltiples planeadas. El peso corporal y la prueba de tolerancia a la glucosa se evaluaron por ANOVA de dos vías. Los datos de metabólica fueron procesados y analizados utilizando el programa MetaboAnalyst 6.0 (Pang et al. 2024). Como tipo de dato se seleccionó la opción de concentración, estableciendo un umbral máximo de

20% para los valores faltantes. Para su normalización se empleó la opción de “autoscaling” Se analizaron por ANOVA de una vía, seguido por un análisis post hoc Fisher LSD. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis discriminante por mínimo cuadrados parciales (PLS-DA), análisis de componentes principales (PCA) así como la generación de mapas de calor (heatmaps) para la visualización de los patrones metabólicos.

Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

RESULTADOS

1. Efecto de la dieta cetogénica en alteraciones morfométricas y metabólicas en ratones BALB/c bajo estrés crónico.

1.1. La dieta cetogénica altera los niveles de cuerpos cetónicos circulantes en condiciones de estrés crónico de manera diferencial por sexo.

Los niveles de β -hidroxibutirato fueron evaluados para confirmar la formación de cuerpos cetónicos circulantes en los grupos con dieta cetogénica. Los ratones macho que consumieron KD presentaron niveles elevados de BHB, tanto en condiciones de reposo o estrés (0.4 y 0.5 mmol/L, respectivamente), en comparación con los grupos estándar (machos, $p=0.0474$ y $p=0.0269$, respectivamente) (Figura 1A). Por otra parte, en las hembras que consumieron KD los niveles de BHB circulantes incrementaron a 0.7 mmol/L ($p=0.0001$) en comparación con los grupos con dieta estándar. Sin embargo, al inducir un estresor en los ratones que consumieron KD se observó una disminución de los niveles de BHB a 0.4 mmol/L, en comparación con el grupo KD sin estrés ($p=0.0149$) (Figura 1B). Esto nos indica que la dieta cetogénica utilizada induce cetosis en el individuo, siendo este efecto atenuado al inducir un estrés crónico en hembras.

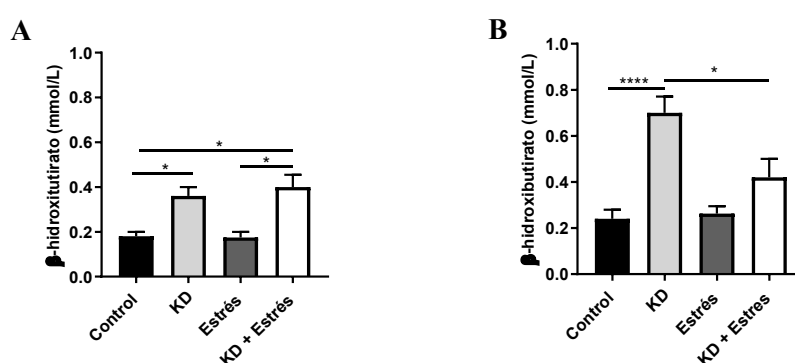


Figura 1. Efecto de la dieta cetogénica sobre los niveles de b-hidroxibutirato en un modelo murino bajo condiciones de estrés crónico y reposo. Niveles de β -hidroxibutirato en sangre en ratones A) machos y B) hembras de la cepa BALB/c al día 23 con dieta cetogénica, dieta estándar y/o estrés crónico. Los resultados se muestran como el promedio \pm error estándar, con un valor de $p \leq 0.05$ considerándose significativo.

1.2. La dieta cetogénica altera el peso corporal, pero no el IMC de manera diferencial por sexo.

Para evaluar los cambios morfométricos relacionados con el consumo de la dieta y sus efectos en condiciones de estrés crónico, monitoreamos la ganancia de peso corporal durante todo el protocolo. En machos, el consumo de KD no alteró el peso corporal, sin embargo, cuando los ratones se sometieron a estrés crónico disminuyeron un 6% del peso corporal, al día 23 del protocolo al comparar con el grupo reposo ($p=0.0001$), considerando el día 1 del protocolo como un 100%. Cuando los machos con dieta estándar se sometieron a estrés perdieron un 6% de peso corporal en comparación con el grupo reposo ($p=0.0001$), como se muestra en la figura 2A. Por otra parte, en hembras, cuando se sometieron a un protocolo de estrés bajo consumo de dieta estándar perdieron un 7% de peso corporal en comparación con el grupo reposo ($p=0.0001$). Finalmente, al consumir KD, las hembras ganaron un 4% de peso corporal en comparación con el grupo con dieta estándar ($p=0.0008$), siendo atenuada esta ganancia de peso al someterlas a un protocolo de estrés crónico ($p=0.0364$) (Figura 2B). Al evaluar el IMC no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos (Figura 2 C y 2D).

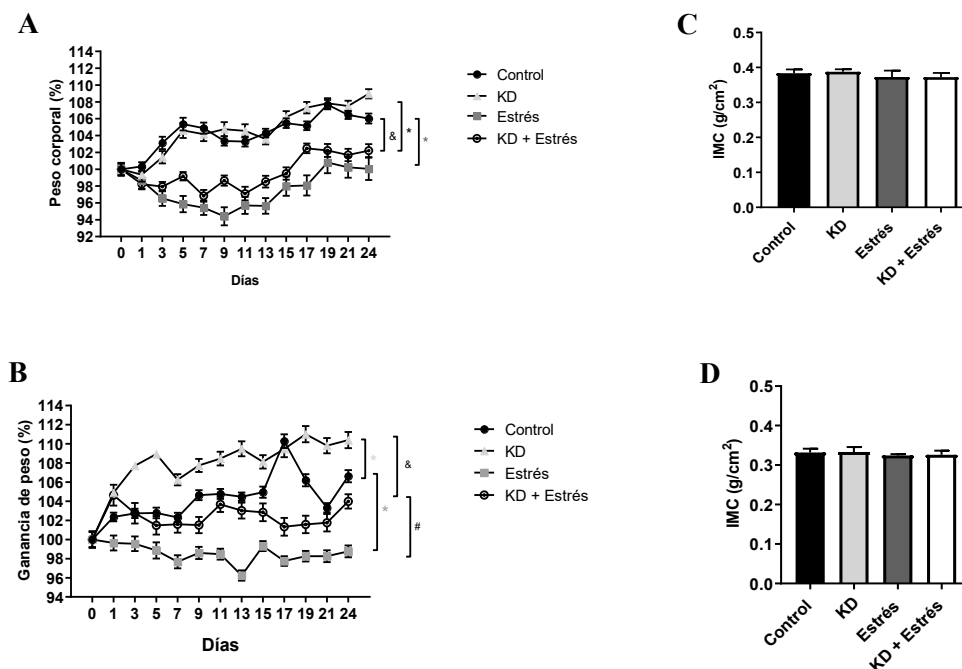


Figura 2: Evaluación del aumento de peso corporal durante los 23 días del protocolo. Los resultados se informaron como porcentaje del peso corporal. Ganancia de peso corporal en ratones A)

machos y B) hembras de la cepa BALB/c, durante 23 días de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. IMC en ratones C) machos y D) hembras de la cepa de ratones BALB/c, durante 23 días de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

1.3.La dieta cetogénica causa alteraciones en el tejido adiposo de manera diferencial por sexo.

Al finalizar el protocolo de experimentación, se pesaron los depósitos de tejido adiposo, interescapular, inguinal y visceral de todos los grupos experimentales. En machos, al pesar la grasa interescapular se observó un incremento en dicho tejido adiposo, en el grupo que consumió KD, en comparación con el grupo dieta estándar ($p= 0.0040$). Al someter al grupo con KD a un estrés crónico, la grasa interscapular incrementó de 1.05 % a 1.9 %, en comparación de los grupos estándar, ya sea en condiciones reposo ($p=0.0006$) o estrés ($p= 0.0002$). Respecto a la grasa inguinal se observó un incremento de 0.98 % a 2.89 % en el grupo KD en comparación con el grupo con dieta estándar ($p=0.0285$). Finalmente, al evaluar la grasa visceral se observó un incremento de 1.5 % a 2.98 % en el grupo KD estrés en comparación con el grupo con dieta estándar ($p=0.0237$) (Figura 3A).

En hembras, al evaluar la grasa interscapular se observó un incremento de 1.4 % a 2.08 % en el grupo KD en comparación con el grupo con dieta estándar ($p=0.0001$). Al someter a los ratones con KD al protocolo de estrés incrementó de un 1.4 % a 2.21 % en comparación con los grupos estándar en reposo ($p=0.003$) o estrés ($p=0.0001$). Respecto a la grasa inguinal, en ratones con KD el porcentaje de grasa inguinal incrementó de 1.05 % a 3.72 % en comparación con el grupo estándar ($p=0.0001$). En hembras, el estrés crónico interviene con el incremento de grasa inguinal ($p=0.0025$). En grasa visceral se observó un incremento de un 2 % a 4.5 % cuando los ratones consumían KD en comparación con el grupo estándar ($p=0.0001$). Cuando las hembras con KD se sometieron a estrés se atenúo el incremento de grasa inguinal ($p=0.0001$) (Figura 3B).

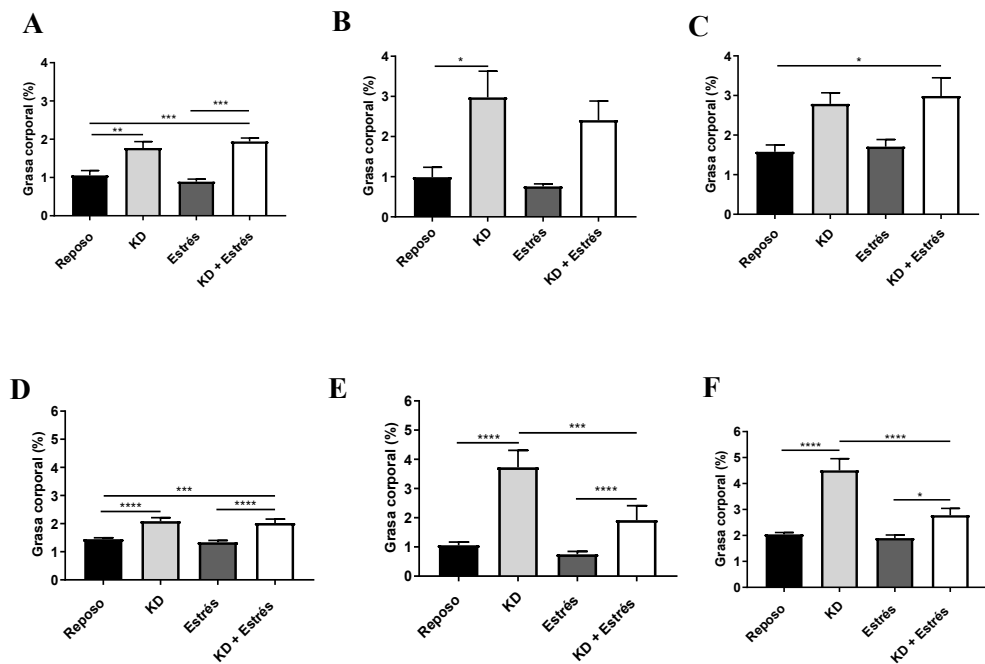


Figura 3: Evaluación del tejido adiposo interscapular, inguinal y visceral al día 23 de estrés por restricción de movimiento, dieta cetogénica o su combinación. Grasa corporal en ratones macho, A) interscapular, B) inguinal, C) visceral y hembras D) interscapular, E) inguinal y F) visceral de la cepa BALB/c, al día 23 de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

1.4. La dieta cetogénica altera la conducta alimentaria en ratones BALB/c bajo restricción de movilidad de manera diferencial por sexo.

Con el fin de evaluar si la ingesta diaria de los ratones era un factor para el incremento de peso y grasa corporal decidimos evaluar el consumo de alimento y agua de nuestros grupos experimentales, así como la ingesta energética. Tanto en machos como en hembras que consumieron KD su consumo de alimento disminuyó, (Figura 4A y 5A, respectivamente), independientemente de las condiciones del grupo experimental (KD: 2 gramos/al día, KD + estrés: 3 gramos/día, $p=0.0001$) en comparación con los grupos con dieta estándar (5 gramos/día). Al evaluar la ingesta energética los ratones macho presentaron una menor ingesta energética (12.8 kcal/día) cuando consumieron dieta cetogénica tanto en condiciones de reposo ($p=0.0494$), como en estrés ($p=0.0002$, $p=0.0059$) (Figura 4B), mientras que en hembras dichos cambios no fueron observados (Figura 5B). Con respecto a la ingesta

de agua los ratones con KD consumieron hasta un 50% menos agua en comparación con los grupos con dieta estándar ($p=0.0001$). En machos, se observó una disminución del consumo de agua en los ratones que consumieron dieta cetogénica, en comparación con el grupo con dieta estándar, consumiendo 4 mL diarios por ratón ($p=0.0001$). Cuando los ratones con KD se sometieron a un protocolo de estrés crónico consumieron menos agua en comparación con el grupo con dieta KD ($p=0.0018$) (Figura 4C). En hembras (figura 5C) se observó una disminución del consumo de agua en los ratones que consumieron KD, independientemente de si se encontraban en condiciones de reposo o estrés ($p=0.0001$).

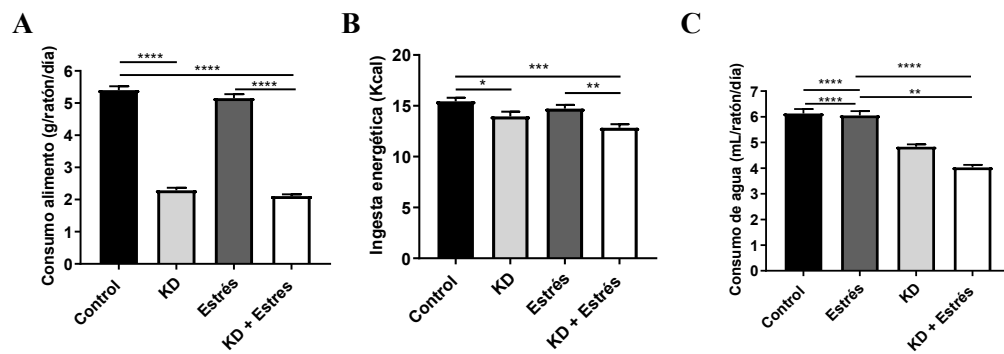


Figura 4: Efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico. Ingesta promedio de A) alimento y B) ingesta de energía, y C) agua de ratones macho de la cepa BALB/c bajo consumo de dieta cetogénica y estrés crónico ($n=5$ por grupo). Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

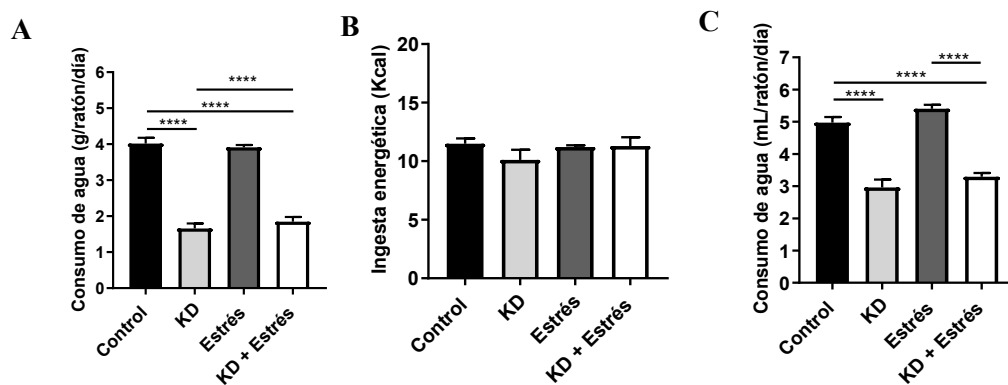


Figura 5: Efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico. Ingesta promedio de A) alimento y B) ingesta de energía, y C) agua de ratones hembra de la cepa BALB/c bajo consumo de dieta cetogénica y estrés crónico ($n=5$ por grupo). Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

1.5. La dieta cetogénica altera la tolerancia a la glucosa en ratones BALB/c bajo restricción de movilidad.

Al día 23 se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, donde los ratones se sometieron a un ayuno por 6 horas, para posteriormente inyectar glucosa intraperitoneal y medir los niveles de glucosa en sangre a diferentes tiempos. En machos con KD se observó una menor tolerancia a la glucosa, tanto en condiciones de reposo (min 30 p=0.0082) como de estrés crónico (min 15 p=0.0138 y min 30 p=0.0273). Al evaluar el AUC se observó un incremento en todos los grupos con KD, ya sea en condiciones de reposo (p=0.0007) como en estrés (p=0.0002) (Figura 6 A y B, respectivamente).

En hembras, el estrés crónico induce una mayor tolerancia a la glucosa, en comparación con el grupo reposo (min 15, p=0.0087). Por otra parte, al evaluar los niveles de glucosa en los grupos que consumieron KD se observó una menor tolerancia a la glucosa tanto en condiciones reposo (min 15 p=0.0421) como en estrés crónico (min 15 p=0.0001, min 30 p=0.0019). Al evaluar el AUC se observó un incremento en los grupos KD reposo (p=0.0187) y KD en estrés (p=0.0001) (Figura 7 C y D, respectivamente).

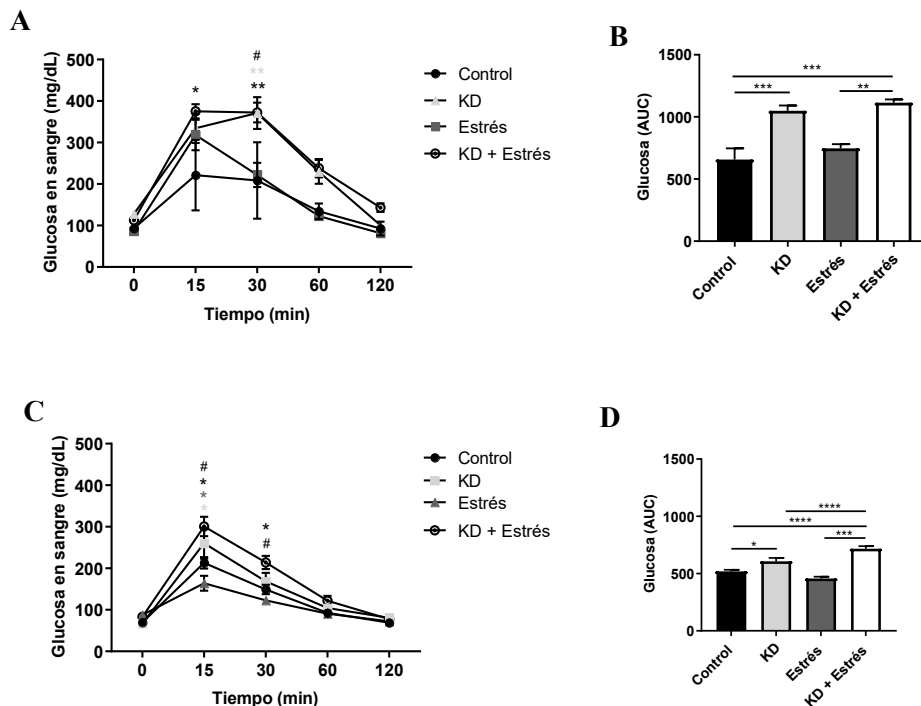


Figura 6: Efecto de la dieta cetogénica, el estrés crónico y su combinación en ratones BALB/c el día 23 del protocolo. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones A) machos y C) hembras de la cepa BALB/c el día 23 del protocolo. Área bajo la curva en ratones B) machos y D) hembras bajo dieta

cetogénica y estrés crónico por restricción de movimiento. Los resultados se muestran como la media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

2. Papel del sistema nervioso adrenérgico beta-2 en las alteraciones morfométricas y metabólicas en respuesta a la dieta cetogénica en ratones BALB/c bajo estrés crónico.

2.3.El sistema nervioso adrenérgico beta-2 está involucrado en la formación de cuerpos cetónicos circulantes de manera diferencial por sexo en ratones con KD.

Con el fin de evaluar si el sistema nervioso adrenérgico está involucrado en los efectos mediados de la dieta cetogénica se midieron los niveles de β -hidroxibutirato en sangre. Al igual que los ratones sin antagonismo adrenérgico, los ratones macho que consumieron KD tratados con propranolol presentaron niveles elevados de BHB, tanto en condiciones de reposo como en estrés (0.4 mmol/L), en comparación con los grupos estándar (machos, $p=0.0007$ y $p=0.0004$, respectivamente), confirmándose que el sistema nervioso adrenérgico beta no está involucrado en la formación de cuerpos cetónicos (Figura 7A). Por otra parte, en las hembras se observó que el antagonismo con propranolol atenuó la formación de cuerpos cetónicos circulantes, en todos los grupos experimentales. En los grupos con dieta cetogénica se observó un incremento de β -hidroxibutirato, sin embargo, los niveles observados (0.2 mmol/L) son equivalentes a los grupos con dieta estándar sin antagonismo ($p=0.0127$). Por otra parte, al estresar los ratones que consumían KD se observó una disminución de β -hidroxibutirato (0.1 mmol/L) ($p=0.0273$). Esto nos indica que, en hembras, el receptor adrenérgico beta-2 está involucrado en la formación de cuerpos cetónicos (Figura 7B).

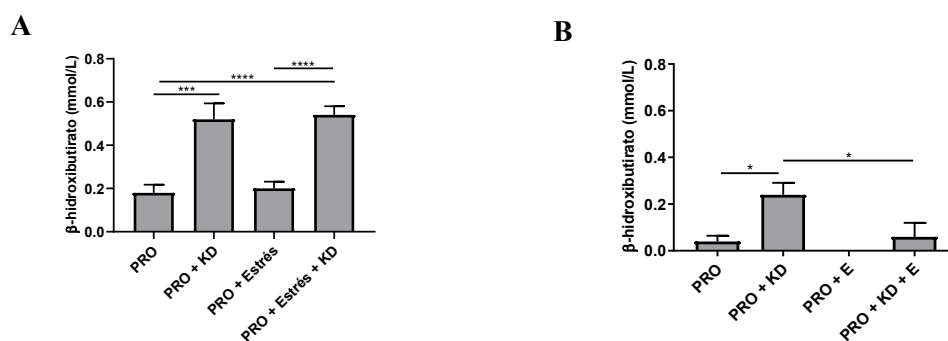


Figura 7. Efecto del antagonismo de receptores beta-adrenérgico sobre los efectos de la dieta cetogénica en los niveles de β-hidroxibutirato en un modelo murino bajo condiciones de estrés crónico y reposo. Niveles de β-hidroxibutirato en sangre en ratones A) machos y B) hembras de la cepa BALB/c al día 23 con dieta cetogénica, dieta estándar y/o estrés crónico inyectados con el antagonista de receptores adrenérgicos, propranolol. Los resultados se muestran como el promedio ± error estándar, con un valor de $p \leq 0.05$ considerándose significativo

2.4. Los efectos de la dieta cetogénica son regulados por el receptor adrenérgico beta-2 en machos.

Para evaluar si los cambios morfométricos encontrados al consumir dieta cetogénica eran mediados por la vía adrenérgica beta-2, se administró el antagonista adrenérgico propranolol, monitoreándose la ganancia de peso corporal durante todo el protocolo. En machos, cuando los ratones consumieron KD en conjunto con el propranolol se observó un incremento del 10% del peso corporal, contrastando con lo observado sin el antagonismo adrenérgico ($p=0.0001$). Al inducir un estresor se observó una disminución de un 3% del peso corporal en comparación con los ratones KD + PRO, efecto similar a los grupos evaluados sin antagonismo (Figura 8A). Por otra parte, en hembras con propranolol, al consumir KD se observó un incremento de un 10% del peso corporal en comparación con dieta estándar ($p=0.0001$), observándose una pérdida de peso al someterlas a un protocolo de estrés crónico ($p=0.0001$), siendo este efecto similar a los grupos experimentales sin antagonismo (Figura 8B). Como se observa en la figura 8C y 8D, al evaluar el IMC en machos no se observaron cambios en ninguno de los grupos, sin embargo, en hembras se observó un menor IMC en los grupos sometidos a estrés crónico, independientemente de la dieta ($p=0.0379$, $p=0.0276$).

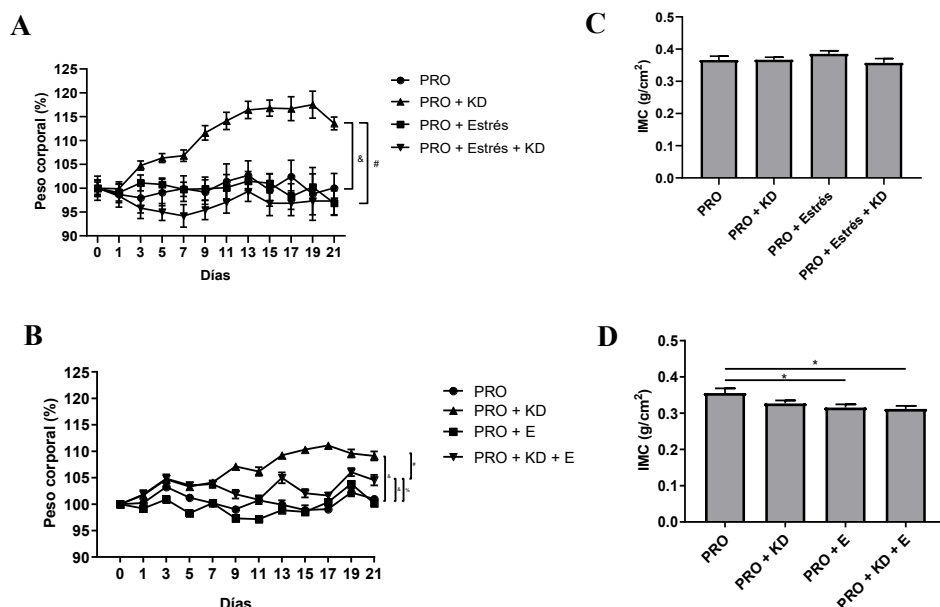


Figura 8. Efecto del antagonismo de receptores beta-adrenérgico sobre los efectos de la dieta cetogénica en la ganancia de peso corporal e IMC en ratones bajo condiciones de estrés crónico y reposo. Los resultados se informaron como porcentaje del peso corporal. Ganancia de peso corporal en ratones A) machos y B) hembras de la cepa BALB/c, durante 23 días de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. IMC en ratones C) machos y D) hembras de la cepa de ratones BALB/c, durante 23 días de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

2.5. Los efectos de la dieta cetogénica sobre los depósitos de tejido adiposo no son regulados por el sistema nervioso adrenérgico beta-2.

En machos con propranolol, al pesar la grasa interescapular se observó un incremento en dicho tejido adiposo, en los grupos que consumieron KD, en comparación con el grupo dieta estándar, tanto en condiciones de reposo ($p=0.0075$) como de estrés crónico ($p=0.0299$). La grasa interscapular incrementó de 1 % a 3 %, en el grupo con KD en comparación con los grupos estándar, ya sea en condiciones reposo ($p=0.0001$) o estrés ($p=0.0009$). Finalmente, al evaluar la grasa visceral se observó un incremento de 1.5 % a 3 % en el grupo KD en comparación con el grupo con dieta estándar ($p=0.0002$), mientras que el grupo KD bajo estrés incrementó un 2 % ($p=0.0251$) (Figura 9A).

En hembras con antagonismo, al someter a los ratones con KD al protocolo de estrés incrementó de un 1.2 % a 2 % en comparación con los grupos estándar ($p=0.0233$) o

estrés ($p=0.0009$). Respecto a la grasa inguinal, en ratones con KD el porcentaje de grasa inguinal incrementó de 1.0 % a 3 % en comparación con el grupo estándar ($p=0.0329$), mientras que en estrés crónico incrementó un 2.1 % ($p=0.0393$), contrastando con los grupos evaluados sin antagonismo adrenérgico. En grasa visceral se observó un incremento de un 2 % a 4.5 % cuando los ratones consumían KD en comparación con el grupo estándar ($p=0.0452$). (Figura 9B).

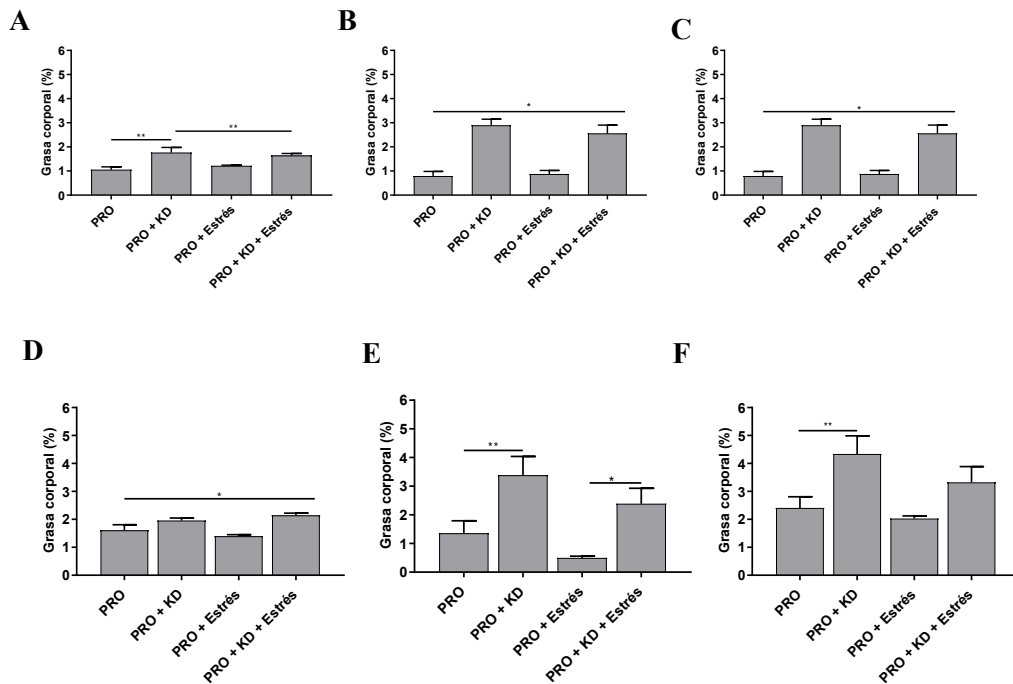


Figura 9: Efecto del antagonismo de receptores adrenérgicos beta en el tejido adiposo interscapular, inguinal y visceral al día 23 de estrés por restricción de movimiento, dieta cetogénica o su combinación. Grasa corporal en ratones macho, A) interscapular, B) inguinal, C) visceral y hembras D) interscapular, E) inguinal y F) visceral de la cepa BALB/c, al día 23 de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

2.6.El sistema nervioso adrenérgico beta-2 está involucrado en la regulación de la conducta alimentaria al consumir dieta cetogénica.

Al administrar el antagonista propranolol, tanto en machos como en hembras que consumieron KD se observó una disminución en el consumo de alimento, (Figura 10A y 11A, respectivamente), independientemente de las condiciones del grupo experimental (KD: 2 gramos/al día, KD + estrés: 3 gramos/día, $p=0.0001$) en

comparación con los grupos con dieta estándar (5 gramos/día). Al evaluar la ingesta energética los ratones macho presentaron una menor ingesta energética cuando consumieron dieta cetogénica en estrés ($p=0.0459$) (Figura 10B), mientras que en hembras se observó una disminución de la ingesta energética en los ratones con KD bajo estrés crónico (Figura 11B).

En machos, se observó una disminución del consumo de agua en los ratones que consumieron dieta cetogénica, en comparación con el grupo con dieta estándar, consumiendo 4 mL diarios por ratón ($p=0.0003$), independientemente del estrés o reposo. Cuando los ratones con KD se sometieron a un protocolo de estrés crónico consumieron menos agua en comparación con el grupo con estrés ($p=0.0001$) (Figura 10C). En hembras (Figura 11C) se observó una disminución del consumo de agua en los ratones que consumieron KD, independientemente de si se encontraban en condiciones de reposo o estrés ($p=0.0001$).

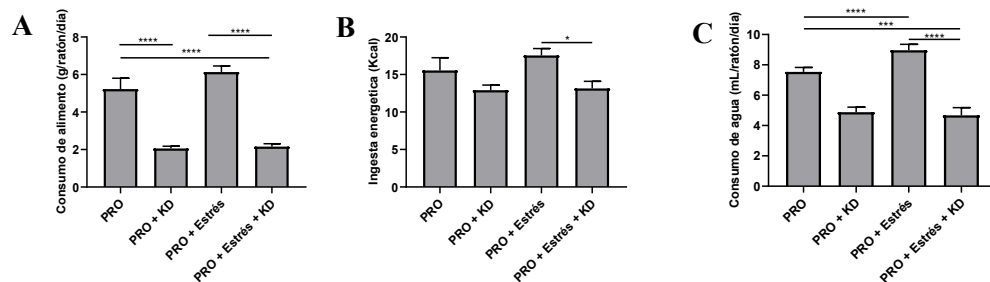


Figura 10: Efecto del antagonista de receptores adrenérgicos beta sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico. Ingesta promedio de A) alimento y B) ingesta de energía, y C) agua de ratones macho de la cepa BALB/c bajo consumo de dieta cetogénica y estrés crónico ($n=5$ por grupo). Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

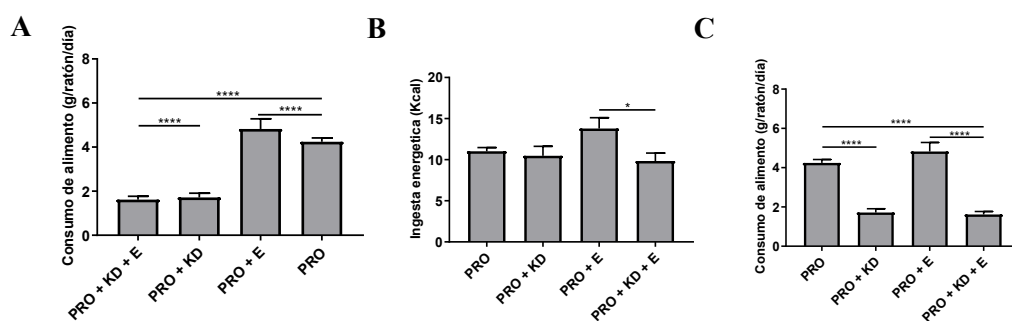


Figura 11: Efecto del antagonista de receptores adrenérgicos beta sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico. Ingesta promedio de A) alimento y B) ingesta de energía, y C) agua de ratones hembra de la cepa BALB/c bajo consumo de dieta cetogénica y estrés crónico (n=5 por grupo). Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

2.7. Los efectos de la dieta cetogénica sobre la tolerancia a la glucosa no se ven alterados al utilizar un antagonista de receptores beta adrenérgico.

En machos con KD se observó una menor tolerancia a la glucosa, tanto en condiciones de reposo (min 30 $p=0.0008$, min 60 $p=0.0003$) como de estrés crónico (min 30 $p=0.0153$ y min 60 $p=0.0033$). Al evaluar el AUC se observó un incremento en todos los grupos con KD, ya sea en condiciones de reposo ($p=0.0001$) como en estrés ($p=0.0024$) (Figuras 12 A y B, respectivamente).

En hembras con propranolol, el estrés crónico induce una menor tolerancia a la glucosa, en comparación con el grupo reposo (min 15, $p=0.0026$). Por otra parte, al evaluar los niveles de glucosa en los grupos que consumieron KD se observó una menor tolerancia a la glucosa tanto en condiciones reposo (min 15 $p=0.0421$, min 30 $p=0.0002$) como en estrés crónico (min 15 $p=0.0001$, min 30 $p=0.0001$). Al evaluar el AUC se observó un incremento en el grupo KD reposo ($p=0.0006$), en comparación con el grupo estándar. Finalmente, al inducir un estrés crónico bajo consumo de KD se observó un incremento de AUC, en comparación con el grupo estándar ($p=0.0001$), y estrés ($p=0.0001$) (Figuras 12 C y D, respectivamente).

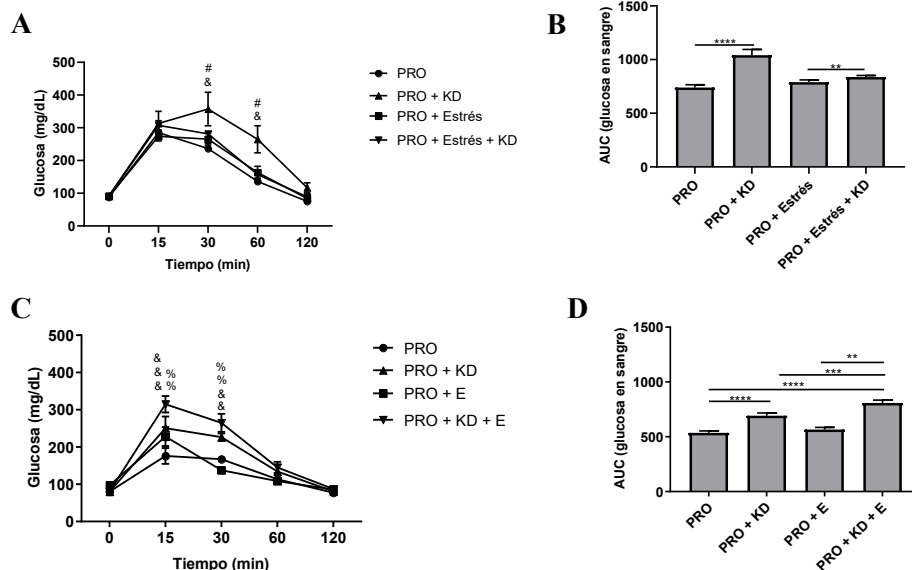


Figura 12: Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho bajo estrés crónico. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones A) machos y C) hembras de la cepa BALB/c el día 23 del protocolo. Área bajo la curva en ratones B) machos y D) hembras bajo dieta cetogénica y estrés crónico por restricción de movimiento.

3. Papel del sistema nervioso adrenérgico beta-3 en las alteraciones morfológicas y metabólicas en respuesta a la dieta cetogénica en ratones BALB/c bajo estrés crónico.

3.1 El sistema nervioso adrenérgico beta-3 se encuentra involucrado en los efectos del estrés crónico sobre la formación de cuerpos cetónicos de manera diferencial por sexo en ratones con KD.

Al igual que los ratones sin antagonismo, observamos que tanto en machos (0.9 mmol/L) como en hembras (0.5666 mmol/L) los niveles de β -hidroxibutirato incrementaban al consumir dieta cetogénica ($p=0.0001$, $p=0.0154$, respectivamente). Por otra parte, al inducir un estresor observamos que, en machos los niveles de BHB no cambiaron, sin embargo, en hembras, la atenuación de β -hidroxibutirato observada sin antagonismo adrenérgico no fue observada ($p=0.4416$) (Figuras 13 A y B, respectivamente). Por lo cual, el sistema nervioso adrenérgico β -3 está involucrado en los efectos del estrés crónico sobre la formación de cuerpos cetónicos al consumir una dieta cetogénica, en hembras.

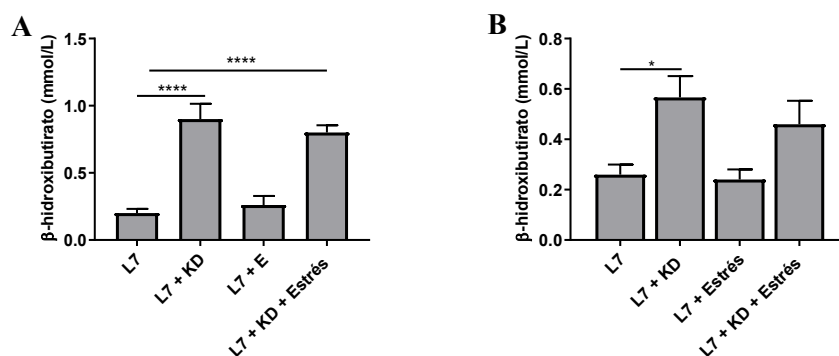


Figura 13. Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre los efectos de la dieta cetogénica en los niveles de β-hidroxibutirato en un modelo murino bajo condiciones de estrés crónico y reposo. Niveles de β-hidroxibutirato en sangre en ratones A) machos y B) hembras de la cepa BALB/c al día 23 con dieta cetogénica, dieta estándar y/o estrés crónico inyectados con el antagonista de receptores adrenérgicos, L-748337. Los resultados se muestran como el promedio ± error estándar, con un valor de $p \leq 0.05$ considerándose significativo.

3.2 El sistema nervioso adrenérgico β-3 juega un papel en el mantenimiento de peso corporal en ratones macho bajo consumo de KD, mientras que en hembras potencia la pérdida de peso observada bajo estrés crónico.

Al evaluar la ganancia de peso corporal, los machos incrementaron un 3% de su peso corporal al consumir dieta cetogénica en comparación con el grupo control ($p=0.0020$), esto al administrar el antagonista L-748337, no observando cambios en el IMC ($p=0.3550$) (Figura 14A y C), En contraste con los resultados observados sin antagonismo, donde los machos no incrementaban su peso corporal al consumir dieta cetogénica. Esto indica que el sistema nervioso adrenérgico β-3 se encuentra involucrado en el mantenimiento del peso corporal en los ratones con dieta cetogénica, pero no en el IMC.

Por otra parte, en hembras no se observaron cambios al administrar el L-748337 (Figura 14B). Los ratones que consumieron dieta cetogénica incrementaron un 10% de su peso corporal en comparación con el grupo con L-7 ($p=0.0001$), mientras que al inducir estrés crónico perdieron un 6% de peso corporal al compararlo con los ratones con dieta cetogénica ($p=0.0001$), mismo efecto observado sin antagonismo adrenérgico. Sin embargo, al inducir un estresor en conjunto con el antagonismo adrenérgico se observó una mayor pérdida de peso corporal, en comparación con el grupo estrés sin antagonismo (estrés 2%, L-7 + estrés 9%, $p=0.0004$), mientras que, en el IMC no se observaron cambios (Figura 14D).

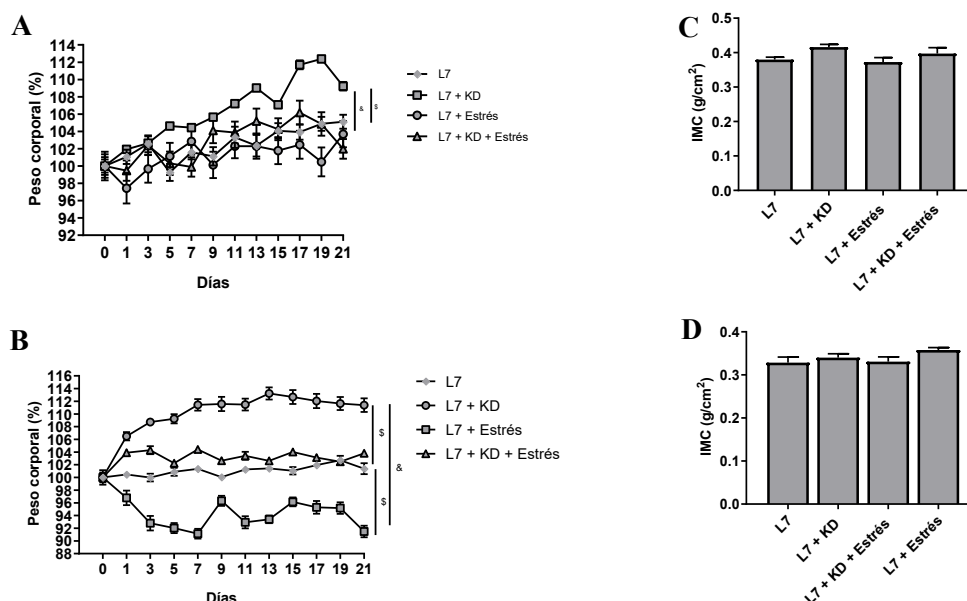


Figura 14. Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre los efectos de la dieta cetogénica en la ganancia de peso corporal e IMC en ratones bajo condiciones de estrés crónico y reposo. Los resultados se informaron como porcentaje del peso corporal. Ganancia de peso corporal en ratones A) machos y B) hembras de la cepa BALB/c, durante 23 días de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. IMC en ratones C) machos y D) hembras de la cepa de ratones BALB/c, durante 23 días de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

3.3 La ganancia de adiposidad observada en ratones que consumen dieta cetogénica no es mediada por la señalización adrenérgica β -3.

En machos, al consumir dieta cetogénica se observó un incremento del tejido adiposo interscapular de 0.90% a 1.79% (Figura 15A), inguinal de 1.53% a 4.27% (Figura 15B) y visceral de 2.10% a 4.54% (Figura 15C), comparándolo con el grupo con dieta estándar ($p=0.0015$, $p=0.006$, $p=0.0001$, respectivamente), observándose el mismo efecto en ratones sin antagonismo adrenérgico. Por otra parte, al estresar a los ratones bajo una dieta cetogénica se observó una disminución de la grasa visceral 4.5% a 2.41% ($p=0.0001$).

Por otra parte, en hembras, no se observaron cambios al bloquear con el antagonista L-748337 (Figura 15D-F). Al consumir dieta cetogénica se observó un incremento de grasa interscapular de 1.26% a 2.52% ($p=0.0001$) y visceral de 2.55% a 4.37% (0.0068), mismos resultados que en los grupos sin antagonismo adrenérgico. Sin embargo, al inducir un estrés crónico bajo consumo de dieta cetogénica no se observó la atenuación de la adiposidad observada sin antagonismo adrenérgico, por lo cual el sistema nervioso adrenérgico β -3 se encuentra involucrado en los efectos del estrés crónico sobre la adiposidad observada bajo consumo de dieta cetogénica.

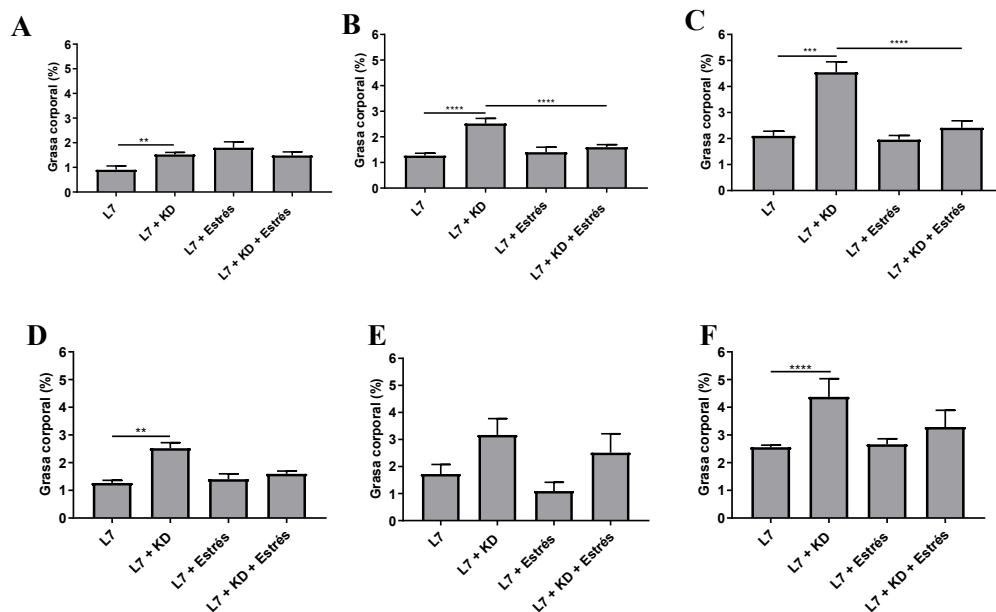


Figura 15: Efecto del antagonismo de receptores adrenérgicos beta en el tejido adiposo interscapular, inguinal y visceral al día 23 de estrés por restricción de movimiento, dieta cetogénica o su combinación. Grasa corporal en ratones macho, A) interscapular, B) inguinal, C) visceral y hembras D) interscapular, E) inguinal y F) visceral de la cepa BALB/c, al día 23 de estrés crónico y consumo de dieta cetogénica. Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

3.4 El sistema nervioso adrenérgico β -3 no está involucrado en los efectos observados en ingesta de alimento y agua de manera dependiente de sexo.

Al igual que en los grupos sin antagonismo, cuando se alimentaron los grupos con dieta cetogénica el consumo de alimento disminuyó de 5.18 g a 2.27 g ($p=0.0001$), así como en estrés crónico, esto al compararlo con el grupo con L-7 (5.18 g a 2.49 g) y grupo L-7 + estrés (5.48 g a 2.49 g) ($p=0.0001$). No se observaron cambios en el IMC bajo ninguna de las condiciones. Por otra parte, el consumo de agua disminuyó de 7.2 mL a 4.06 mL en el grupo con dieta cetogénica, tanto en condiciones de reposo ($p=0.0001$), como en estrés ($p=0.0015$) (Figura 16 A-C).

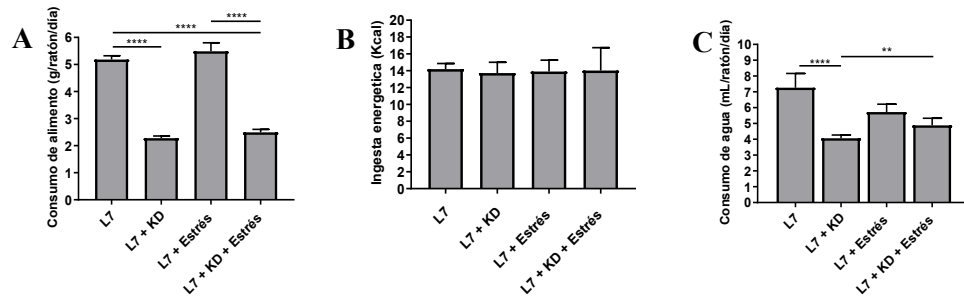


Figura 16: Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones macho bajo estrés crónico. Ingesta promedio de A) alimento y B) ingesta de energía, y C) agua de ratones macho de la cepa BALB/c bajo consumo de dieta cetogénica y estrés crónico (n=5 por grupo). Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

Al evaluar el consumo de alimento en hembras con dieta cetogénica se observó una disminución de 3.7 g a 1.92 g ($p=0.0001$), tanto en reposo, como en estrés crónico ($p=0.0001$). Por otra parte, al inducir un estrés en los ratones con L-7, se observó un incremento de la ingesta de alimento de 3.7 g a 4.56 g ($p=0.0029$). No se observaron cambios en ingesta energética bajo ninguna condición. Finalmente, bajo dieta cetogénica, el consumo de agua disminuyó tanto en condiciones de reposo ($p=0.0001$) como de estrés ($p=0.0001$) (Figura 17A-C).

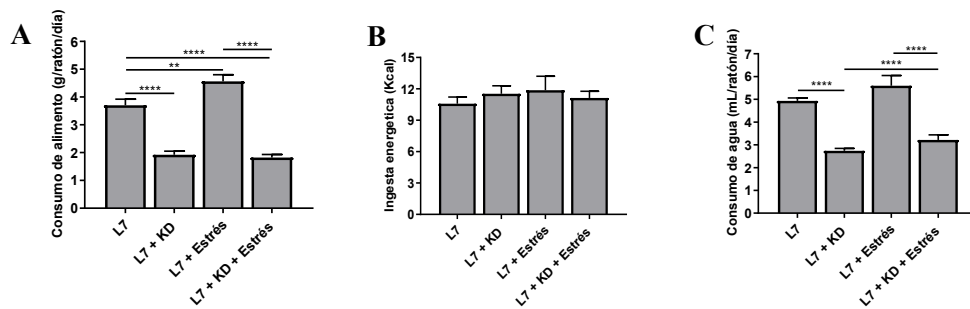


Figura 17: Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 a sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la conducta alimentaria en ratones hembra bajo estrés crónico. Ingesta promedio de A) alimento y B) ingesta de energía, y C) agua de ratones hembra de la cepa BALB/c bajo consumo de dieta cetogénica y estrés crónico (n=5 por grupo). Los resultados se muestran como media \pm error estándar, considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$.

3.5 La menor tolerancia a la glucosa observada en ratones con dieta cetogénica es modulada por el receptor adrenérgico b-3 en machos, pero no en hembras.

Al realizar el bloqueo adrenérgico β -3 no se observaron cambios en ninguno de los grupos que consumieron dieta cetogénica (Figura 18A). De igual forma, al evaluar el AUC no se observaron cambios (Figura 18C).

En el caso de las hembras, al evaluar los niveles de glucosa en los grupos que consumieron KD se observó una menor tolerancia a la glucosa tanto en condiciones reposo (min 15 p=0.0041, min 30 p=0.0030) como en estrés crónico (min 15 p=0.0001, min 30 p=0.0001) (Figura 18B). Por otra parte, al evaluar el AUC se observó un incremento en los grupos que consumieron dieta cetogénica, tanto en condiciones de reposo como en estrés crónico (p=0.0001) (Figura 18D).

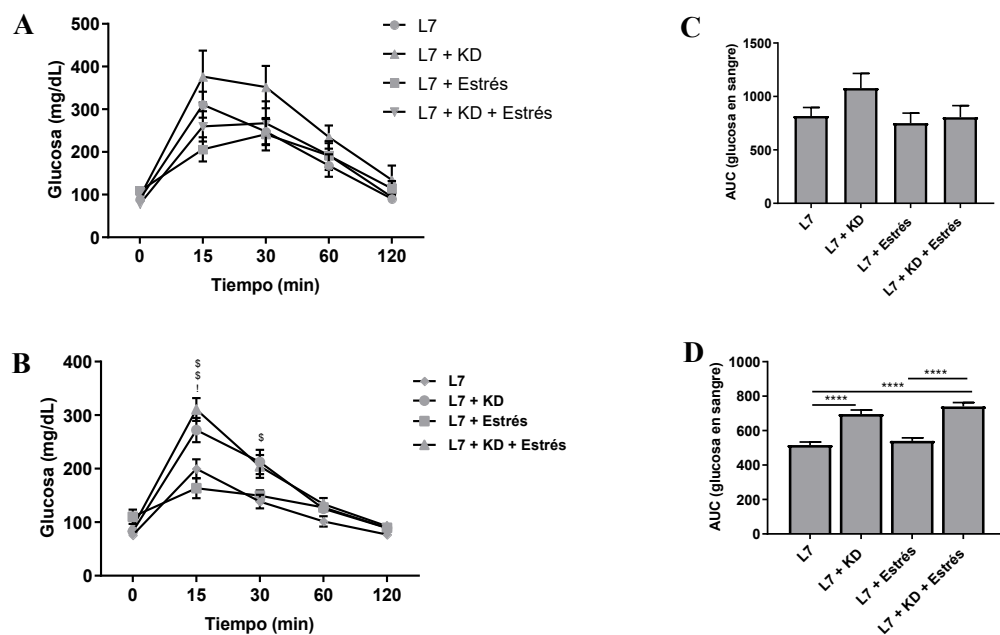


Figura 18: Efecto del antagonismo del receptor adrenérgico beta-3 sobre el efecto de la dieta cetogénica sobre la tolerancia a la glucosa en ratones macho bajo estrés crónico. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones A) machos y C) hembras de la cepa BALB/c el día 23 del protocolo. Área bajo la curva en ratones B) machos y D) hembras bajo dieta cetogénica y estrés crónico por restricción de movimiento.

4. Determinar el efecto del estrés crónico y la dieta cetogénica sobre el metaboloma de ratones hembra de la cepa BALB/c.

Con el fin de evaluar si el metaboloma de hembras BALB/c era alterado bajo estrés crónico y dieta cetogénica se realizó una prueba de ANOVA, realizando posteriormente la prueba post hoc Fisher LSD para determinar que metabolitos se encontraban alterados. Se puede observar que, de 411 metabolitos evaluados, 56 fueron significativos (Figura 19). Al realizar la prueba post hoc de Fisher LSD, se observa que los principales metabolitos que destacan son Homocitrulina ($p=8.2568E^{-6}$), Sulfato de 4-etilfenilo ($p=1.1248E^{-5}$), TG (20:5_34:2) ($p=2.4283E^{-5}$), TG (20:5_36:3) ($p=2.6317E^{-5}$) y Ácido indol-3-propiónico ($p=4.0287E^{-5}$) (Figuras 20 A, B, C, D y E, respectivamente). Cabe destacar que en los niveles de los metabolitos mencionados con anterioridad se observa una disminución bajo el consumo de dieta cetogénica, independientemente de la condición reposo o estrés.

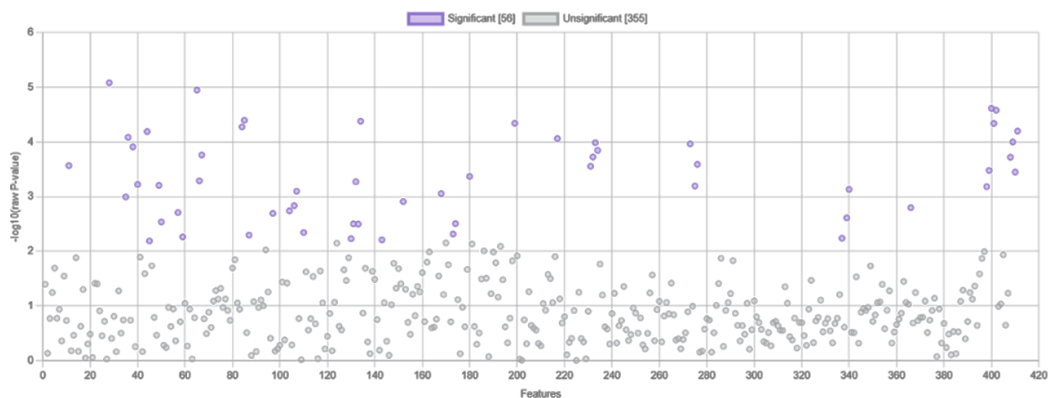


Figura 19: Análisis de varianza (ANOVA) de los metabolitos identificados en plasma de ratones hembra BALB/c bajo estrés crónico, dieta cetogénica o reposo.

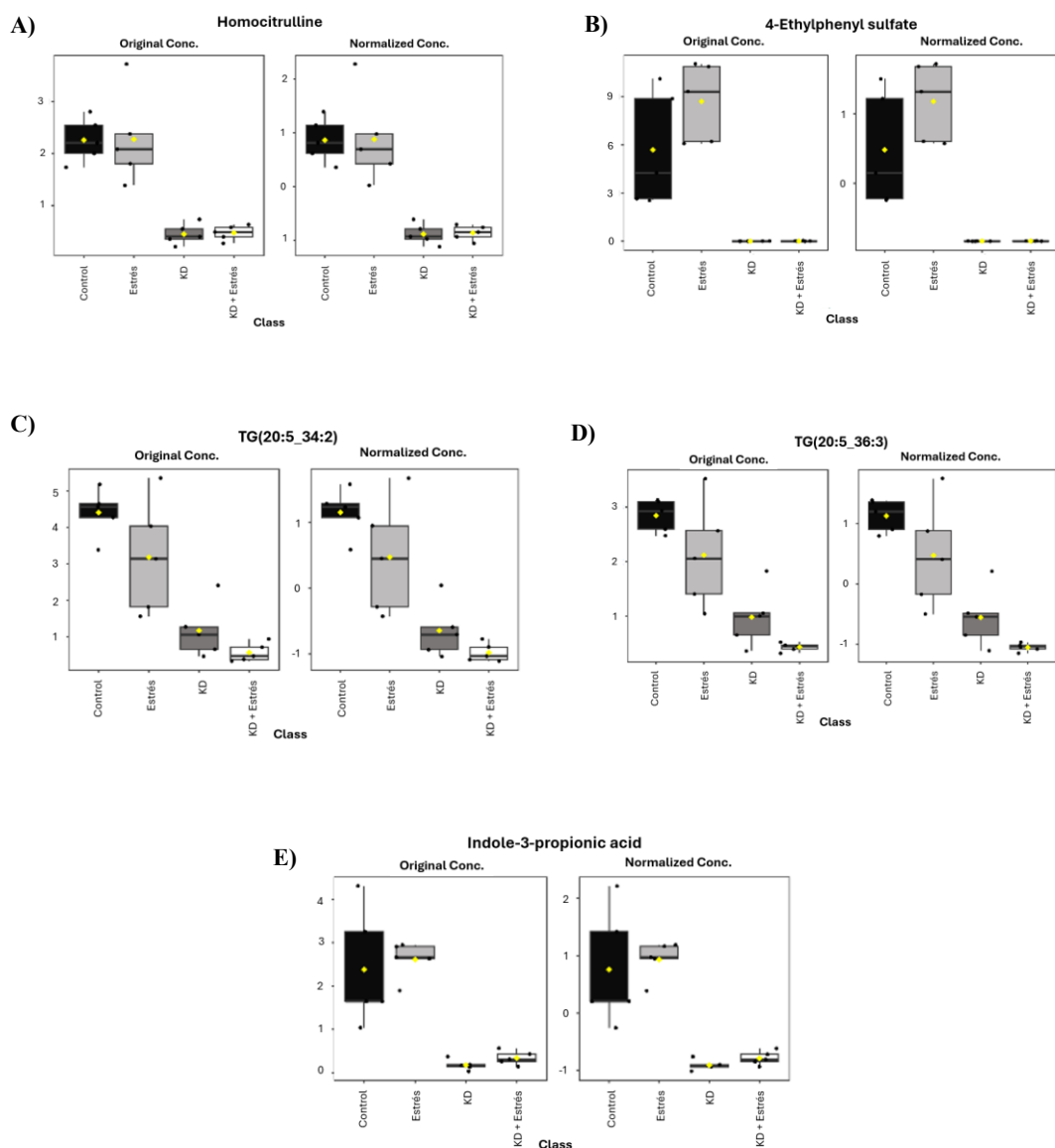


Figura 20: Metabolitos identificados a partir de la prueba post hoc Fisher LSD. Una vez realizado la prueba ANOVA se realizó una prueba post hoc para identificar los metabolitos significativos encontrados en plasma de ratones hembra de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y dieta cetogénica. A) Homocitrulina B) Sulfato de 4-etilfenilo, C) TG (20:5_34:2), D) TG (20:5_36:3) y E) Ácido indol-3-propiónico. Se consideran significativos los valores de $p \leq 0,05$.

Posteriormente se realizó un análisis PLS-DA con el fin de evaluar la similitud o diferencia entre los grupos experimentales. Como se observa en la figura 21, el grupo control y estrés se encuentran distribuidos de forma similar, indicando similitudes entre los metabolitos, independientemente de la condición en la que los grupos se encuentren. Por otra parte, se puede observar una diferencia entre los grupos con

dieta cetogénica al compararlos con los que consumieron dieta estándar. Los grupos con KD tanto en reposo como en estrés se encuentran agrupados entre sí.

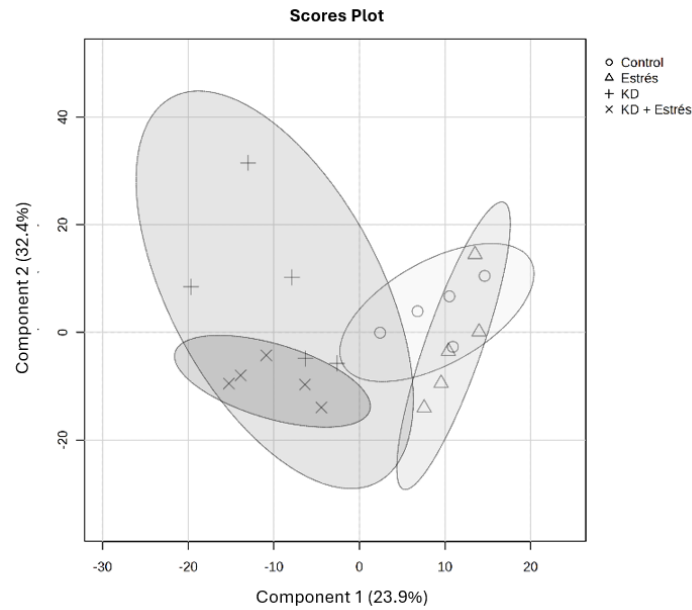
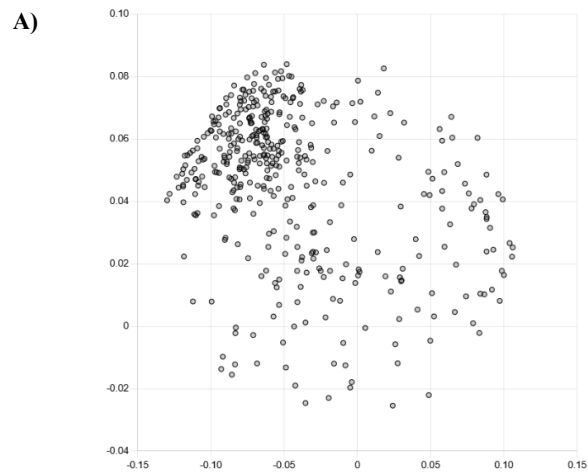


Figura 21: Análisis PLS-DA de muestras de plasma de hembras de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y/o dieta cetogénica.

El gráfico de cargas, obtenido a partir del PLS-DA muestra la distribución de los metabolitos de acuerdo con su carga, siendo los más alejados a 0 aquellos que mostraron mayor diferencia entre los grupos (Figura 22A). Entre ellos destacan Homocitrulina (0.086519), TG (20:5_34:1) (0.084068), TG (20:5_34:0) (0.084052) y N2-Acetyl-Ornithine (0.084051). (Figura 22B -D).



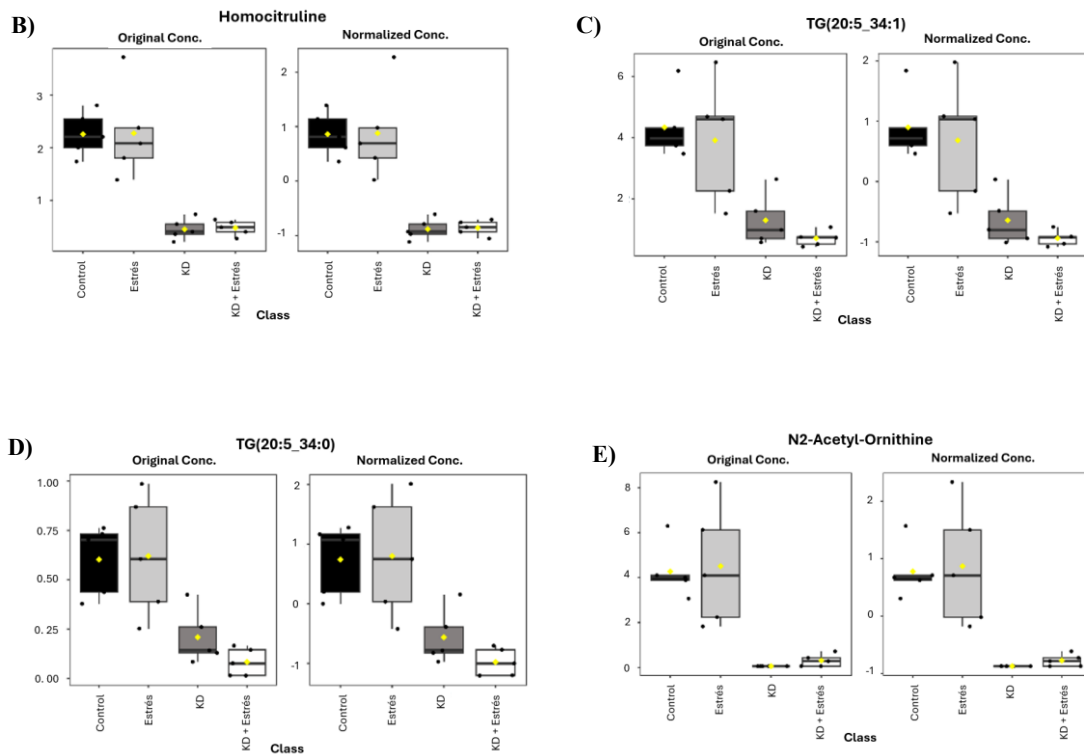


Figura 22: Análisis PLS-DA de muestras de plasma de hembras de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y/o dieta cetogénica. A) Grafico de cargas de metabolitos obtenidos a partir de plasma. B) Homocitruilina, C) TG (20:5_34:1), D) TG (20:5_34:0) y E) N2-Acetyl-Ornithine.

Al realizar el análisis PLS-DA se observan los principales metabolitos afectados bajo las condiciones de estrés crónico, reposo, dieta cetogénica y dieta cetogénica + estrés, en hembras. Como se observa en la figura 23 los metabolitos con valores de VIP superiores a 1.8 se consideran los metabolitos con mayor cambio entre grupos. Entre ellos podemos observar Homocitruilina (VIP 2.024), Sulfato de 4-etilfenilo (VIP 1.9694), Ácido indol-3-propiónico (VIP 1.9668), considerados como los metabolitos con valores más altos. Al realizar las comparativas entre grupos, se puede observar que dichos metabolitos comparten el mismo comportamiento; se encuentran a la baja en condiciones de KD, incluso bajo estrés crónico. Además, metabolitos asociados al metabolismo lipídico, como ceramidas (HexCer(d18:1/1), HexCer(d18:1/2)), triglicéridos (TG (20:5_34:2), TG (20:5_36:2)) y fosfatidilcolinas (PC aa C38:4), mostraron diferencias entre grupos,

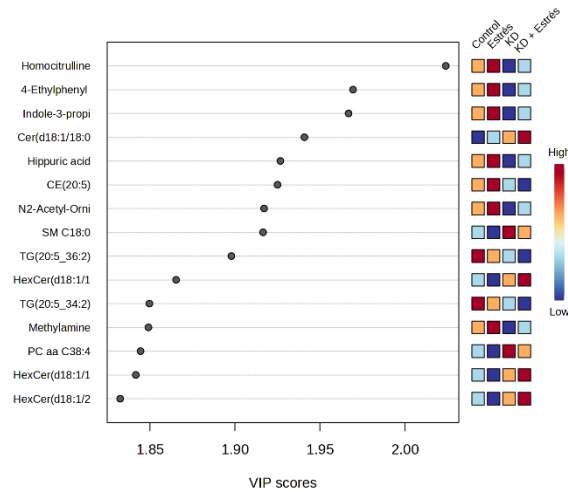


Figura 23: Grafico de valores VIP de muestras de plasma de ratones hembra de la cepa BALB/c bajo estrés crónico y dieta cetogénica. De forma vertical se encuentran los principales metabolitos, mientras de forma horizontal los valores VIP.

Al realizar un heatmap podemos observar que existe una diferencia metabólica entre los grupos experimentales. En los grupos con KD se puede observar un incremento en los niveles de triglicéridos y ceramidas como lo son HerCer(d18:1/16:0), HerCer(d18:1/18:0), HerCer(d18:1/22:0), HerCer(d18:1/20:0), Cer(d18:1/16:0), SM C18:0 y PC aa C24:0. Por otro lado, metabolitos como N2-Acetil-Ornitina y Ácido Hipúrico muestran mayor abundancia en los grupos controles y estrés en comparación con los grupos que consumieron KD (Figura 24).

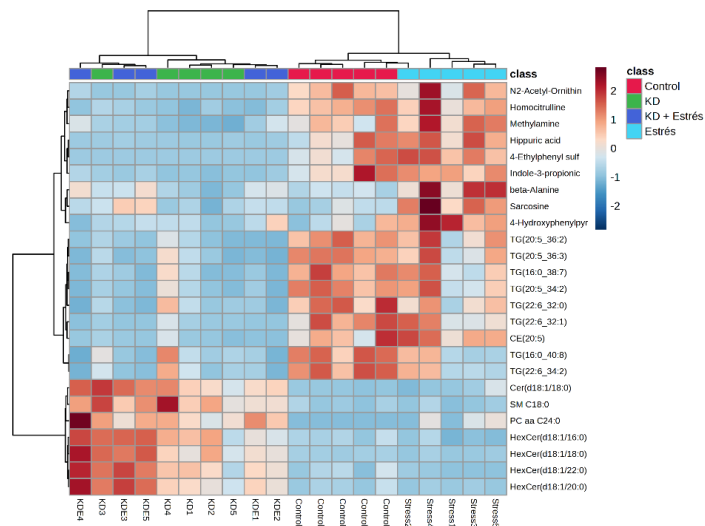


Figura 24: Heatmap de los metabolitos plasmáticos significativamente alterados en muestras de plasma de ratones hembra BALB/c bajo estrés crónico y/o dieta cetogénica.

DISCUSIÓN

En este estudio, nosotros evaluamos el efecto de la dieta cetogénica sobre las alteraciones morfológicas y metabólicas, así como su efecto en enfermedades crónicas como el estrés. Nuestros resultados muestran que la dieta induce cambios en el peso corporal, ingesta de agua, alimento y la tolerancia a la glucosa, encontrándose estas alteraciones tanto en machos como en hembras de la cepa BALB/c, observándose que estos efectos son parcialmente atenuados en condiciones de estrés crónico, particularmente en hembras.

Para evaluar que la dieta administrada induce un estado de cetosis nutricional evaluamos los niveles de cuerpos cetónicos en sangre, particularmente β -hidroxibutirato, un cuerpo cetónico considerado un elemento clave en los efectos neuroprotectores y anti-inflamatorios observados en enfermedades crónico-degenerativas (Yamanashi et al. 2017). Los cuerpos cetónicos circulantes son producidos bajo diferentes condiciones en el organismo como ayuno, inanición, ejercicio prolongado y regímenes alimenticios como la dieta cetogénica (Massod, 2023; Puchalska P. & Crawford, 2017). En nuestro estudio, los animales que consumieron dieta cetogénica desarrollaron altos niveles de cuerpos cetónicos circulantes, comparado con los grupos alimentados con dieta estándar (Kennedy et al. 2007; Kizing et al. 2005; Sahagun et al. 2021). Se ha reportado que, durante estrés agudo, los niveles de BHB incrementan (Kubera et al. 2014; Nishiguchi et al. 2021; Son et al. 2021), sin embargo, en nuestro estudio esto no fue evaluado, considerándose una perspectiva de este trabajo. Sato y colaboradores (2023) reportaron que en ratones C57BL/6 bajo un protocolo de estrés agudo por estrés social, los niveles de BHB incrementaron, mientras que el establecimiento de un protocolo de estrés por 10 días no alteró significativamente los niveles plasmáticos de BHB, lo cual coincide con nuestros resultados. En nuestro estudio, en condiciones de estrés crónico no se observaron cambios en los niveles de BHB comparados con los grupos bajo condiciones de reposo.

Para los animales con dieta cetogénica, aunque se observaron cambios en ambos sexos, bajo estrés crónico los niveles de BHB circulantes fueron menores en hembras, indicando que el estrés crónico altera los niveles de cuerpos cetónicos circulantes de manera dependiente de sexo en ratones BALB/c, esto contrastando nuestros resultados con lo observado por Sahagun en ratas (2019).

Numerosos reportes han demostrado los efectos en el peso corporal al consumir KD, siendo asociado principalmente a la pérdida de peso, así como a la disminución de la grasa corporal (Brownlow et al. 2017; Douris et al. 2017). En nuestro estudio este efecto no fue observado, en las hembras que consumieron dieta cetogénica se observó un incremento tanto del peso corporal como de la grasa corporal, no observándose alteraciones en el IMC en ninguno de los grupos evaluados. Mientras tanto, las hembras sujetas a estrés crónico consumidoras de dieta cetogénica este incremento de peso corporal fue atenuado, demostrando que el estrés crónico reduce los efectos de la dieta cetogénica sobre los parámetros morfométricos. Sahagun y colaboradores (2019) reportaron que, en ratas Long Evans, sometidas a estrés crónico impredecible por 21 días consumidoras de dieta cetogénica, los efectos del peso corporal mediados por el estrés crónico no fueron observados, señalando que la dieta cetogénica protegía a las hembras de los efectos del estrés. Esto coincide con nuestros resultados en hembras.

Por otra parte, cuando alimentamos a los machos con KD no se observaron cambios en el peso corporal, mientras que, en aquellos sujetos a estrés crónico perdieron peso independientemente del tipo de dieta consumida. Mientras que la grasa corporal incrementó, independientemente de las condiciones en las que los ratones se encontraban. Esto nos indica que los resultados son de manera diferencial por sexo. Una de las razones por las que se puede encontrar estas alteraciones entre sexos es por la presencia de hormonas sexuales y sus diferentes roles en el ratón, principalmente por la presencia de estrógeno en el ciclo hormonal (Mauvais – Jarvis, 2015). En este trabajo no se evaluó el ciclo estral de la hembra con el fin de evitar cualquier estresor adicional que pudiera influir en nuestros resultados. Sin embargo, se considera a futuro realizar experimentos considerando el ciclo estral como un factor adicional.

Como observamos un incremento en el peso y la grasa corporal, decidimos evaluar el consumo de alimento, agua, así como la ingesta energética para explicar esta ganancia de peso. En ambos sexos observamos que, cuando los ratones consumían KD, tanto el consumo de agua como de alimento disminuía a la mitad de su consumo en condiciones de dieta estándar. Con esto en consideración, calculamos la ingesta energética, encontrando solamente en machos una disminución, sugiriendo que el consumo de alimento no está relacionado directamente con la ganancia de peso. Se ha reportado que la dieta cetogénica induce saciedad, lo cual ha sido confirmado en

este trabajo. Por lo tanto, evaluar alteraciones como la leptina o grelina, así como proteínas implicadas en la regulación del metabolismo, podría ser una perspectiva de este trabajo. FGF21 es uno de ellos y se ha correlacionado directamente con la regulación metabólica y la termogénesis, siendo uno de los principales implicados en el consumo de la dieta cetogénica, y uno de los principales candidatos de su regulación (Murata et al. 2013; Watanabe et al. 2020). Además, se ha demostrado que FGF21 está directamente relacionado con la ingesta dietética (Song et al. 2018). Al consumir una dieta baja en carbohidratos, el metabolismo del organismo se ve alterado debido a la poca disponibilidad de la glucosa para emplearse como fuente de energía. Como resultado, el cuerpo se ve obligado a alterar su metabolismo, buscando una fuente de energía alterna a través de la cetogénesis, lo que lleva a niveles más bajos de glucosa y una mejora en los niveles de insulina. En nuestro estudio, bajo el régimen dietético, los ratones que consumieron dieta cetogénica mostraron una menor tolerancia a la glucosa o niveles elevados de glucosa en sangre, lo que contrasta con diversos autores que reportan un mejoramiento en el metabolismo de la glucosa, ya sea con la misma cepa de ratón, mismo porcentaje de macronutrientes, o diferentes protocolos de administración de la dieta (Moreno et al. 2014; Watanabe et al. 2020). Por otro lado, algunos autores han reportado resultados similares a los encontrados en nuestros estudios, teniendo como factor común la misma dieta utilizada en este trabajo (Kinzig et al. 2010). Una posibilidad de estos efectos es la composición de la dieta ya que está compuesta principalmente por aceite de soja y manteca de cerdo, con grasa tanto saturada como insaturada, además de un contenido proteico de un 15%. Esta composición podría interferir con los efectos de la dieta. Se recomienda que la composición proteica de la dieta sea inferior a un 10% ya que las proteínas pueden servir como fuente de energía a través de la gluconeogénesis, lo que puede interferir con los efectos de la dieta cetogénica, como lo es la pérdida de peso (Griffin et al. 2020).

Una vez obtenidos los resultados de los experimentos de dieta cetogénica y estrés crónico, decidimos evaluar el papel del sistema nervioso adrenérgico en estos efectos. Para ello utilizamos los antagonistas adrenérgicos propanolol y L-748337 para evaluar los efectos observados en los experimentos anteriores. Al administrar propanolol, observamos que los niveles de cuerpos cetónicos circulantes fueron atenuados bajo todas las condiciones, siendo este efecto potenciado bajo estrés

crónico, observándose este efecto exclusivamente en hembras. Esto coincide con los experimentos realizados por Vahed y colaboradores (1987) donde evaluaron el efecto del antagonista propanolol sobre la cetosis en personas que realizan ejercicio, encontrando que, aquellas que tenían altos niveles de cetosis sin realizar algún ejercicio los niveles de cuerpos cetónicos disminuían. Además, se ha reportado que el bloqueo β -adrenérgico causa alteraciones en la tasa de lipólisis, triglicéridos y ácidos grasos, esto en personas bajo ayuno con administración de propanolol (Klein et. al, 1989). Sin embargo, existen pocos reportes de participación del sistema β -adrenérgico en los efectos de la dieta cetogénica.

Por otra parte, según nuestro trabajo, el sistema nervioso adrenérgico β -3 está involucrado en los efectos del estrés crónico sobre cetogénesis, esto al administrar el antagonista L-748337, ya que la disminución de los niveles de β -hidroxibutirato observados en hembras fue restaurada. Diversos autores han señalado que uno de los posibles mediadores de las diferencias por sexo observadas bajo regímenes dietéticos es FGF21, siendo activado a través de la activación del sistema nervioso (Sauza & Ryan, 2024). Además, se ha demostrado que el consumo de KD activa el eje HPA, siendo FGF21 un mediador clave de sus efectos, al ser considerado un marcador de cetosis y una hormona clave del estrés metabólico (Ryan et al. 2017).

Con respecto al peso corporal los ratones macho con dieta cetogénica incrementaron su peso corporal, en comparación con los ratones sin antagonismo. Esto nos indica que el sistema nervioso adrenérgico β -1,2 está involucrado en las alteraciones morfométricas de los machos, mientras que en hembras se observa una mayor pérdida de peso bajo antagonismo β -3 con KD y estrés crónico. Douris y colaboradores (2017) demostraron que si bien, la dieta cetogénica inducía una pérdida de peso corporal, el bloqueo adrenérgico inhibió dicho efecto, lo que indica que el sistema nervioso β -adrenérgico está involucrado en los cambios en el peso corporal. Hallazgo que coincide con nuestros experimentos al utilizar antagonistas adrenérgicos.

Una vez observados la modulación de los efectos de KD bajo estrés, decidimos evaluar los depósitos de tejido adiposo. En hembras, al inducir un estrés crónico bajo

consumo de dieta cetogénica no se observó la atenuación de la adiposidad encontrada sin antagonismo adrenérgico, por lo cual el sistema nervioso adrenérgico β_1 , 2 y 3 se encuentra involucrado en los efectos del estrés crónico sobre la adiposidad observada bajo consumo de KD. Se ha demostrado que el bloqueo β -adrenérgico, impide la pérdida de tejido adiposo en ratones que consumieron dieta cetogénica, impidiendo además el gasto energético (Douris et al. 2017). Por otra parte, se ha demostrado que el sistema nervioso adrenérgico, a través de los receptores β_3 -adrenérgicos, participa en la activación de BAT. La liberación de norepinefrina desde las terminaciones nerviosas simpáticas induce su unión a los receptores β_3 -AR presentes en los adipocitos, activando la vía adenilato ciclasa-AMPC-proteína quinasa A (PKA), conduciendo a la expresión de UCP1. Este proceso estimula la termogénesis y aumenta el gasto energético, promoviendo la oxidación de lípidos y la pérdida de peso corporal (Bartelt & Heeren, 2014; Ricquier, 2017). Por lo cual, los resultados observados en hembras en este experimento coinciden con los reportes.

Con respecto a la tolerancia a la glucosa, no se observaron alteraciones en los grupos experimentales al utilizar L-748337, en contraste con los experimentos sin antagonismo, esto nos indica que la vía adrenérgica β_3 se encuentra involucrada en el metabolismo de la glucosa, siendo este efecto observado solamente en machos. Esto coincide con lo reportado por Nonogaki y Takao (2017) donde se demuestra que el uso del antagonista α_1 adrenérgico, prazosina, altera la tolerancia a la glucosa, en ratones con ayuno de 5 horas, regulando a la baja FGF21 hepático. Esto nos indica que el sistema nervioso adrenérgico está involucrado en las alteraciones observadas en este trabajo, sin embargo, es necesario considerar la posible participación de los receptores α -adrenérgicos en estos efectos.

Con respecto al análisis metabolómico en hembras consumidoras de KD y dieta estándar bajo condiciones de reposo y estrés, se observó que entre los metabolitos más relevantes destacaron homocitrulina, sulfato de 4-etilfenilo, triglicéridos específicos (TG 20:5_34:2 y TG 20:5_36:3) y ácido indol-3-propiónico, los cuales mostraron una disminución asociada al consumo de dieta cetogénica, independientemente de su condición. Se ha reportado que el incremento de homocitrulina se encuentra implicado en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como ataxia, deterioro cognitivo (Camacho & Rioseco-

Camacho, 2012; Zanatta et al. 2016). Si bien, no hay reportes hasta el momento que involucren directamente el impacto de homocitrulina en dieta cetogénica o estrés crónico, podríamos relacionar los resultados observados con dieta cetogénica con una posible neuroprotección. Por otra parte, se ha reportado que bajo dieta cetogénica incrementan los niveles de ceramidas y triglicéridos (Long et al. 2023; Sanbolín-Escobales et al. 2022). Estos resultados coinciden con lo observado en este proyecto, indicando que la dieta cetogénica causa alteraciones en el metaboloma.

CONCLUSIONES

El consumo de una dieta cetogénica induce alteraciones metabólicas, morfométricas y de conducta alimentaria, en ambos sexos. El estrés crónico, por otra parte, atenúa los efectos observados bajo KD, disminuyendo el incremento de peso corporal y los niveles plasmáticos de BHB en hembras de la cepa BALB/c.

La pérdida de adiposidad bajo dieta cetogénica ocasionada por el estrés crónico en hembras es mediada por la vía adrenérgica beta-1,-2,-3, mientras que la vía adrenérgica beta 1,2 está involucrada en los efectos del estrés sobre la cetosis inducida por KD. En machos, el incremento de peso corporal observado en dieta cetogénica es mediado por la vía beta 1, 2

El consumo de la dieta cetogénica altera el perfil metabolómico plasmático, en hembras, independientemente del estrés crónico.

Estos resultados sugieren una interacción entre el estrés crónico y una dieta cetogénica alta en grasas que modifica sus efectos de manera dependiente del sexo, así como el papel del sistema nervioso adrenérgico en los efectos observados.

PERSPECTIVAS

Evaluar si los efectos de la dieta cetogénica observados en este trabajo son debidas a la composición de esta. Para ello se implementará el uso de dietas cetogénicas que difieran su composición de macronutrientes, principalmente de grasa y proteína.

Debido a las alteraciones morfométricas y metabólicas observadas en el estudio, es necesario evaluar hormonas como leptina, ghrelina, así como proteínas implicadas en el metabolismo como FGF21.

Si bien, en este trabajo observamos el sistema β -adrenérgico está implicado en los efectos de la dieta cetogénica, es necesario plantear el uso de antagonistas de receptores adrenérgicos selectivos, tanto α - adrenérgicos como β -adrenérgicos, tomando en consideración todos los receptores adrenérgicos.

Debido a que observamos diferencias por sexo, principalmente en estrés crónico y dieta cetogénica, es necesario considerar el ciclo estral de la hembra en experimentos posteriores, descartando el ciclo estral como un posible factor adicional.

REFERENCIAS

1. Bartelt, A., & Heeren, J. 2014. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*, 10: 24–36.
2. Batch, J. T., Lamsal, S. P., Adkins, M., Sultan, S., y Ramirez, M. N. 2020. Advantages and disadvantages of the ketogenic diet: a review article. *Cureus*, 12:1- 8.
3. Baum, A. 1990. Stress, intrusive imagery, and chronic distress. *Health Psychology* 9: 653-675.
4. Camacho J. &, Rioseco-Camacho. 2025. Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria syndrome. GeneReviews. Recuperado el 05 de febrero de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97260/>
5. Cicero, A. F. G., Benelli, M., Brancaleoni, M., Dainelli, G., Merlini, D., y Negri, R. 2015. Middle and long-term impact of a very low-carbohydrate ketogenic diet on cardiometabolic factors: a multi-center, cross-sectional, clinical study. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 22: 389-394.
6. Davis, J. J., Fournakis, N., y Ellison, J. 2020. Ketogenic diet for the treatment and prevention of dementia: a review. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 34:3-10.
7. Dhabhar F.S., y McEwen BS. 1997. Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 11:286–306.
8. Dhabhar, F. S. 2000. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: the role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917:876-893.
9. Dhabhar, F. S. 2014. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunologic Research*, 58: 193-210.
10. Douris, N., Melman, T., Pecherer, J. M., Pissios, P., Flier, J. S., Cantley, L. C., y Maratos-Flier, E. 2015. Adaptive changes in amino acid metabolism permit normal longevity in mice consuming a low-carbohydrate ketogenic diet. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

Molecular Basis of Disease, 1852: 2056–2065.

11. Douris, N., Desai, B. N., Fisher, M., Cisu, T., Fowler, A. J., Zarebidaki, E., y Maratos-Flier, E. 2017. Beta-adrenergic receptors are critical for weight loss but not for other metabolic adaptations to the consumption of a ketogenic diet in male mice. *Molecular Metabolism*, 6:854-862.
12. El-Rashidy, O. F., Nassar, M. F., Abdel-Hamid, I. A., Shatla, R. H., Abdel-Hamid, M. H., Gabr, S. S., y Shaaban, S. Y. 2013. Modified Atkins diet vs classic ketogenic formula in intractable epilepsy. *Acta Neurologica Scandinavica*, 128: 402–408.
13. Fu, S.-P., Wang, J.-F., Xue, W.-J., Liu, H.-M., Liu, B.-, Zeng, Y.-L., Liu, J.-X. 2015. Anti-inflammatory effects of BHBA in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models are mediated by GPR109A-dependent mechanisms. *Journal of Neuroinflammation*, 12: 9.
14. Friedman, J.M., Leibel, R.L., Siegel, D.S., Walsh, J., Bahary, N. 1991. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11: 1054-1062.
15. Goldberg, E. L., Asher, J. L., Molony, R. D., Shaw, A. C., Zeiss, C. J., Wang, C., y Dixit, V. D. 2017. β -hydroxybutyrate deactivates neutrophil NLRP3 inflammasome to relieve Gout Flares. *Cell Reports*, 18: 2077-2087.
16. Gouin, J.-P. 2011. Chronic stress, immune dysregulation, and health. *American Journal of Lifestyle Medicine*, 5: 476–485.
17. Gupta, D., Chuang, J.-C., Mani, B. K., Shankar, K., Rodriguez, J. A., Osborne- Lawrence, S., y Zigman, J. M. 2019. β 1-adrenergic receptors mediate plasma acyl- ghrelin elevation and depressive-like behavior induced by chronic psychosocial stress. *Neuropsychopharmacology*, 44: 1319-1327.
18. Kennedy, A. R., Pissios, P., Otu, H., Xue, B., Asakura, K., Furukawa, N., ... Maratos-Flier, E. 2007. A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 292: E1724–E1739.
19. Klein, S., Peters, E. J., Holland, O. B., & Wolfe, R. R. 1989. Effect of short- and long-term beta-adrenergic blockade on lipolysis during fasting in humans. *AJP Endocrinology and Metabolism*, 257: E65–E73.

20. Kovács, K.J., Miklós, I.H., Bali, B., y Huston, J.P. 2005. Psychological and physiological stressors. *Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress*. 15: 775-792.
21. Laukova, M., Vargovic, P., Krizanova, O., y Kvetnansky, R. 2010. Repeated Stress Down-Regulates β 2- and α 2C-Adrenergic Receptors and Up-Regulates Gene Expression of IL-6 in the Rat Spleen. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 30: 1077–1087.
22. Laukova, M., Vargovic, P., Vlcek, M., Lejavova, K., Hudecova, S., Krizanova, O., y Kvetnansky, R. 2013. Catecholamine production is differently regulated in splenic T- and B-cells following stress exposure. *Immunobiology*, 218: 780- 789.
23. Laukova, M., Vargovic, P., Rokytova, I., Manz, G., y Kvetnansky, R. 2017. Repeated stress exaggerates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in the rat spleen. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38: 195-208.
24. Long, F., Bhatti, M. R., Kellenberger, A., Sun, W., Modica, S., Höring, M., Liebisch, G., Krieger, J., Wolfrum, C., & Challa, T. D. 2023. A low-carbohydrate diet induces hepatic insulin resistance and metabolic associated fatty liver disease in mice. *Molecular Metabolism*, 69: 101675.
25. Masood, W. 2020. Ketogenic Diet. Recuperado el 14 diciembre de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29763005/>.
26. Murphy, P., Likhodii, S., Nylen, K., y Burnham, W. M. 2004. The antidepressant properties of the ketogenic diet. *Biological Psychiatry*, 56: 981-983.
27. Nijhuis, L. E., Olivier, B. J., Dhawan, S., Hilbers, F. W., Boon, L., Wolkers, M. C., *et al.* 2014. Adrenergic β 2 receptor activation stimulates anti-inflammatory properties of dendritic cells *in vitro*. *PLoS ONE*, 9: e85086.
28. Nonogaki, K., & Kaji, T. (2016). α 1-Adrenergic receptor downregulates hepatic FGF21 production and circulating FGF21 levels in mice. *Neuroscience Letters*, 638: 35–38.
29. Qiao, G., Chen, M., Bucsek, M. J., Repasky, E. A., y Hylander, B. L. 2018. Adrenergic signaling: a targetable checkpoint limiting development of the antitumor immune response. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-15.

30. Padgett, D. A., i Glaser, R. 2003. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*, 24: 444–448.
31. Pang, Z., Lu, Y., Zhou, G., Hui, F., Xu, L., Viau, C., Spigelman, A. F., MacDonald, P. E., Wishart, D. S., Li, S., & Xia, J. 2024. MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. *Nucleic Acids Research*, 52: W398-W406.
32. Peters, E. M. J., Schedlowski, M., Watzl, C., y Gimsa, U. 2021. To stress or not to stress: Brain-behavior-immune interaction may weaken or promote the immune response to SARS-CoV-2. *Neurobiology of Stress*, 14: 100296.
33. Ricquier, D. 2017. UCP1, the mitochondrial uncoupling protein of brown adipocyte: A personal contribution and a historical perspective. *Biochimie*, 134: 3–8.
34. Ryan, K. K., Packard, A. E. B., Larson, K. R., Stout, J., Fourman, S. M., Thompson, A. M. K., y Ulrich-Lai, Y. M. 2017. Dietary manipulations that induce ketosis activate the HPA axis in male rats and mice: a potential role for fibroblast growth factor-21. *Endocrinology*, 159: 400-413.
35. Sahagun, E., Ward, L. M., y Kinzig, K. P. 2019. Attenuation of stress-induced weight loss with a ketogenic diet. *Physiology & Behavior*, 212: 112654.
36. Sambolín-Escobales, L., Tirado-Castro, L., Suarez, C., Pacheco-Cruz, D., Fonseca-Ferrer, W., Deme, P., Haughey, N., Chompre, G., & Porter, J. T. 2022. High-Fat Diet and Short-Term Unpredictable Stress Increase Long-Chain Ceramides Without Enhancing Behavioral Despair. *Frontiers In Molecular Biosciences*, 9: 859760.
37. Sauza, K. a. S., & Ryan, K. K. 2024. FGF21 mediating sex dependent response to dietary macronutrients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 109:e1689-e1696.
38. Shimazu, T., Hirschey, M. D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., y Verdin, E. 2012. Suppression of oxidative stress by β -Hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*, 339: 211-214.
39. Slota, C., Shi, A., Chen, G., Bevans, M., y Weng, N.-. 2015b.

- Norepinephrine preferentially modulates memory CD8 T cell function inducing inflammatory cytokine production and reducing proliferation in response to activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 46: 168-179.
40. Stephens M. A., y Wand G. 2012. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol Res.* 34: 468–483.
 41. Szelényi, J., y Vizi, E. S. 2007. The Catecholamine Cytokine Balance: Interaction between the Brain and the Immune System. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1113: 311–324.
 42. Tieu, K., Perier, C., Caspersen, C., Teismann, P., Wu, D.-C., Yan, S.-D., y Przedborski, S. 2003. D- β -Hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*, 112: 892-901.
 43. Vahed, Y. A., Koeslag, J. H., & De V Lochner, J. J. 1988. β -Adrenergic blockade counteracts starvational ketosis, but aggravates post-exercise ketosis in non-athletes. *Journal of Endocrinology*, 119: 167–171.
 44. Veech, R. L. 2004. The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 70: 309–319.
 45. Wieduwild, E., Girard-Madoux, M. J., Quatrini, L., Laprie, C., Chasson, L., Rossignol, R., y Ugolini, S. 2020. β 2-adrenergic signals downregulate the innate immune response and reduce host resistance to viral infection. *Journal of Experimental Medicine*, 217: 1-12.
 46. Wong, K., Raffray, M., Roy-Fleming, A., Blunden, S., y Brazeau, A. S. 2020. The ketogenic diet seen as a normal way of eating by adults with type 1 and type 2 diabetes: a qualitative study. *Canadian Journal of Diabetes*. 45: 137-143. e.1.
 47. Youm, Y.-H., Nguyen, K. Y., Grant, R. W., Goldberg, E. L., Bodogai, M., Kim, D., y Dixit, V. D. 2015. The ketone metabolite β -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature Medicine*, 21: 263– 269.
 48. Yancy, W. S., Olsen, M. K., Guyton, J. R., Bakst, R. P., y Westman, E. C. 2004. A low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-fat diet to treat obesity and hyperlipidemia. *Annals of Internal Medicine*, 140:769.

49. Zanatta, Â., Rodrigues, M. D. N., Amaral, A. U., Souza, D. G., Quincozes-Santos, A., & Wajner, M. 2016. Ornithine and Homocitrulline Impair Mitochondrial Function, Decrease Antioxidant Defenses and Induce Cell Death in Menadione-Stressed Rat Cortical Astrocytes: Potential Mechanisms of Neurological Dysfunction in HHH Syndrome. *Neurochemical Research*, 41: 2190-2198.
50. Zhang L., Pan J., Chen W., Jiang J., y Huang J. 2020. Chronic stress-induced immune dysregulation in cancer: Implications for initiation, progression, metastasis, and treatment. *Am. J. Cancer Res.* 10:1294–1300.

