



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Participación de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) del sistema límbico de ratas adolescentes en la conducta alimentaria”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

CLAUDIA AIMÉE ESTRADA AVILA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

2005



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m 348954



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Participación de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) del sistema
límbico de ratas adolescentes en la conducta alimentaria"

realizado por Estrada Avila Claudia Aimée

con número de cuenta 09621441-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Directora de Tesis

Propietario Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo *Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo*

Propietario Dra. Carolina López Rubalcava *Carolina López Rubalcava*

Propietario Dra. Lucía Alba Martínez Mota *Lucía Alba Martínez Mota*

Suplente Dra. Marcela Margarita Morales Mulia *Marcela Margarita Morales Mulia*

Suplente M. en Psicobiol. Lilian Mayagoitia Novales *Lilian Mayagoitia Novales*

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



Agradecimientos.

*“Vivir es saber soñar
y saber mantenerse despierto”*
Mario Benedetti

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

por ser parte fundamental en mi desarrollo académico, por todo lo que he aprendido y logrado en ella, por todas las personas maravillosas que he conocido aquí, por eso y muchas cosas más me siento orgullosa de pertenecer a esta Universidad.

A la Dra. Patricia de Gortari:

por permitirme ser parte de tu equipo de trabajo y ser mi guía en el transcurso de este proyecto. Gracias por los consejos, por tu disposición, tu amistad, por las palabras de aliento y además por tu infinita e inagotable paciencia, que sé que conmigo fue muy necesaria.

A mis sinodales:

Dra. Carolina López, Dra. Lucía Martínez, Dra. Marcela Morales y a la Maestra Lilian Mayagoitia, gracias por brindarme un poco de su valioso su tiempo, por su disposición a ayudarme y los valiosos consejos que me permitieron enriquecer mi trabajo.

Dedicatorias.

A mis padres Gilberto y Teresita

no hay palabras para expresar lo que siento,
gracias por ayudarme a encontrar el camino
cuando más me sentía perdida, por su apoyo incondicional,
por el amor, por los consejos, en fin... por todo
y muchas cosas más los amo, los amo, los amo!!.

A mi hermano Iván

de quien he aprendido que hay que
tener siempre “amor a la camiseta”
y que en ocasiones no tomarse las
cosas tan en serio
es una clave para ser más feliz,
te quiero pijooso.

A Mauricio

no me alcanzan las palabras ni el tiempo
para decirte lo importante que eres para mí
y lo inmensamente feliz que soy de que estemos juntos.
Este triunfo también es tuyo ya que me has
dado tu apoyo en todo momento y me impulsaste
a seguir adelante cuando creía que no podía lograrlo,
gracias por tu paciencia y en pocas palabras... te amo!!!

A mis abuelos

Teresa, Mario y Ubaldo,
pido a Dios que los llene de salud y
me permita tenerlos conmigo por mucho tiempo.

A mi abuela Hortensia

de quien tengo amorosos recuerdos
y sé que estaría muy orgullosa de mí.

A mis tíos y primos

de las familias Estrada Olvera, Estrada Hernández,
Estrada León, Estrada Pérez, Avila Valverde y Avila Pérez,
gracias por compartir este triunfo conmigo
y por estar siempre al pendiente... los quiero familia!!.

A Patricia Chávez
quien ya es parte de mi familia y tiene
un lugar muy importante en mi corazón,
gracias por el apoyo y el consuelo,
te estaré eternamente agradecida.

Ana Laura y Gabriela.

Sin importar el tiempo o la distancia
seguimos siendo tan unidas como siempre,
no tienen idea de lo afortunada
que soy conocerlas.
Por esos inolvidables momentos... las quiero!.

Sandra y Tania.

Los momentos que hemos compartido
han formado un lazo muy estrecho de confianza
y amistad sincera entre nosotras,
gracias por el apoyo que me han dado,
recuerden que estaré con ustedes
siempre que me necesiten...las quiero!.

**A Miriam, Libo, Everardo,
Mariana, Ana, Marcela y Rosa.**

Además de compartir el gusto por esta carrera,
compartimos experiencias que me permitieron
conocerlos como los grandes amigos
y compañeros que son.

INDICE.

RESUMEN.	1
1. INTRODUCCIÓN.	
1.1 Ingesta de alimentos y homeostasis.....	3
1.2 Hormona liberadora de tirotropina (TRH).....	9
1.3 Anorexia nervosa	19
2. JUSTIFICACIÓN.	24
3. OBJETIVOS.	26
4. HIPÓTESIS.	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	27
5.1. Animales.....	27
5.2 Experimento.....	28
5.3 Disecciones.....	28
5.4 Extracción de TRH.....	29
5.5 Radioinmunoensayo de TRH.....	29
5.6 Radioinmunoensayo de tirotropina (TSH) en suero de rata.....	30
5.7 Radioinmunoensayo de corticosterona.....	31
5.8 Ensayo ELISA para cuantificación de leptina	32
5.9 Cuantificación de proteínas por el método Lowry.....	33
5.10 Ensayo colorimétrico para medir actividad de tiroliberinasa.....	33
5.11 Análisis estadístico.....	34
6. RESULTADOS.	35
6.1. Peso.....	35
6.2 Consumo de alimento.....	36
6.3 Consumo de líquido.....	38
6.4 Contenido de TRH en hipotálamo.....	40
6.5 Contenido de TRH en la eminencia media y en la concentración sérica de TSH	41
6.6 Concentración sérica de corticosterona.....	42
6.7 Concentración sérica de leptina.....	44
6.8 Actividad de tiroliberinasa en suero.....	45
6.9 Contenido de TRH en el sistema límbico.....	46
7. DISCUSIÓN.	53
7.1.Cambios en el peso corporal	53
7.2 Cambios en el eje hipotalámico-pituitario-tiroideo (HPT)	56
7.3 Cambios en el contenido de TRH en el sistema límbico.....	60

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. CONCLUSIONES.	67
9. PERSPECTIVAS.	68
10. REFERENCIAS.	68
11. ANEXO.	79

- 5-HT Serotonina.
- α -MSH Hormona estimulante del α -melanocito.
- ACTH Corticotropina.
- ADP Área dorsal parvocelular.
- AgRP Proteína relacionada al agouti.
- AHA Área hipotalámica anterior.
- ALM Área lateral magnocelular.
- AN Anorexia nervosa.
- ApOL Área preóptica lateral.
- AV3V Área anteroventral del 3er. ventrículo.
- AVP Área ventral parvocelular.
- β -END Beta endorfina.
- CART Transcrito regulador de cocaína-anfetamina.
- CCK Colecistoquinina.
- CPE Carboxipeptidasas.
- CRH Hormona liberadora de corticotropina.
- DA Dopamina.
- EM Eminencia media.
- F Fórnix.
- GABA Ácido γ -aminobutírico.
- GHRH Hormona liberadora de la hormona de crecimiento.
- HDM Hipotálamo dorsomedial.
- HL Hipotálamo lateral.
- HPA Eje hipotalámico-pituitario-adrenal.
- HPF Hipotálamo perifornical.
- HPT Eje hipotalámico-pituitario-tiroideo.
- HT Hormonas tiroideas.
- IMC Índice de masa corporal.
- MCH Hormona concentradora de melanina.
- MC4Rs Receptores de melanocortina.
- NArc Núcleo arcuato.
- NDM Núcleo dorsomedial.
- NPV Núcleo paraventricular.
- NPY Neuropeptido Y.
- NSO Núcleo supraóptico.
- NSQ Núcleo supraquiasmático.
- NsT Núcleo subtalámico.
- NT Neurotensina.
- NVM Núcleo ventromedial.
- PC Prohormona convertasa.
- POM Área preoptica medial.
- POMC Proopiomelanocortina.
- PPII Piroglutamil aminopeptidasa II.
- SNC Sistema nervioso central.
- SP Sustancia P.
- T3 Triiodotironina.
- T4 Tetraiodotironina o Tiroxina.
- TRH Hormona liberadora de tirotropina.
- TRH-R Receptor a TRH.
- TSH Hormona estimulante de la tiroides o Tirotropina.

(resultados).

- **Gráfica 1.** Cambios en el peso corporal35
- **Gráfica 2.** Consumo de alimento 36
- **Gráfica 3.** Consumo de líquido39
- **Gráfica 4.** Contenido de TRH en hipotálamo40
- **Gráfica 5.** Concentración sérica de TSH y
 contenido de TRH en la eminencia media41
- **Gráfica 6.** Concentración de corticosterona en suero43
- **Gráfica 7.** Concentración de leptina en suero44
- **Gráfica 8.** Actividad de tiro liberinasa en suero45
- **Gráfica 9.** Concentración de TRH en corteza frontal47
- **Gráfica 10.** Concentración de TRH en corteza insular48
- **Gráfica 11.** Concentración de TRH en amígdala49
- **Gráfica 12.** Concentración de TRH en hipocampo50
- **Gráfica 13.** Concentración de TRH en núcleo accumbens51
- **Tabla 1.** Cambios en el contenido de TRH en
 diferentes regiones límbicas52

Resumen.

En este trabajo se investiga la participación de TRH el sistema límbico de ratas adolescentes en la conducta alimentaria aplicando modelos de anorexia y restricción alimentaria. La conducta alimentaria tiene la función de mantener las reservas de energía para las demandas del cuerpo; es una actividad compuesta de diferentes eventos fisiológicos y está influenciada por factores culturales, sociales y biológicos. En el control de la conducta alimentaria participan vías neuronales, neurotransmisores y neuropéptidos; se reconoce al hipotálamo como el centro integrador de diferentes señales involucradas en la homeostasis entre la ingestión de comida y el gasto de energía y los diferentes núcleos que componen al hipotálamo se encuentran conectados a mecanismos neuronales que afectan esta conducta. Además del hipotálamo, diferentes regiones del sistema límbico (importante para controlar procesos emocionales) están involucradas en la regulación de la conducta alimentaria. En situaciones de baja disponibilidad de nutrimentos la concentración de señales anorexigénicas (inhiben el apetito) disminuye, mientras que se activan las de péptidos orexigénicos (estimulan el apetito); estas señales convergen en el NPV del hipotálamo donde la hormona de liberadora de tiotropina (TRH) es sintetizada. El TRH induce la síntesis y liberación de tiotropina (TSH), quien a su vez estimula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas en lo que se conoce como el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HHT); además de que se ha implicado a TRH en trastornos como la depresión y la ansiedad, se ha reportado su participación como un agente anorexigénico ya que disminuye la ingesta de alimentos en ratas y se sugiere que TRH puede participar en aspectos motivacionales en la conducta de ingestión de alimentos; por lo que suponemos que cambios diferenciales en el contenido de TRH del hipotálamo y de diferentes regiones del sistema límbico implicadas en la regulación de la conducta alimentaria en modelos de anorexia (por deshidratación y consumo de etanol) y de restricción alimentaria forzada permitirán involucrar la participación de TRH en aspectos relacionados a esta conducta. Se utilizaron 30 ratas Wistar hembras de cinco semanas de nacidas, formándose cinco grupos con peso homogéneo al inicio del experimento: a) grupo control: agua y alimento *ad libitum*, b) grupo sal: alimento *ad libitum* y una solución salina al 2.5%, c) grupo pareado: alimento en la misma cantidad que consumieron las ratas del grupo sal y agua *ad libitum*, d) grupo etanol: alimento *ad libitum* y una solución de etanol al 20% como fuente de

líquido, e) grupo glucosa: misma cantidad de alimento que consumieron las ratas del grupo etanol y una solución isocalórica de glucosa con respecto a la solución del grupo etanol. Se registró diariamente el peso de los animales, así como el consumo de alimento y líquido. La duración del experimento fue de cinco días con el sacrificio de los animales para la extracción de cerebro y la posterior disección de las siguientes regiones: eminencia media, hipotálamo, corteza frontal, corteza insular, hipocampo, amígdala y núcleo accumbens para evaluar el contenido de TRH por radioinmunoensayo. Se colectó el suero para evaluar los cambios en las concentraciones séricas de leptina (gasto de reservas energéticas) por ensayo ELISA, corticosterona (estrés) y tirotropina (adaptación del eje tiroideo) por radioinmunoensayo, así como la actividad de tiro liberinasa en suero (degradación de TRH en suero y cambios metabólicos causados por pérdida de peso) por ensayo colorimétrico. Se observó pérdida de peso significativa así como el bajo consumo de alimento en los grupos sometidos a los modelos de anorexia, además del aumento de corticosterona y la baja concentración de leptina; un aumento en el contenido de TRH en la eminencia media así como baja concentración de TSH apareció solo en la restricción alimentaria lo que mostró una activación diferencial del eje tiroideo en deshidratación. En el sistema límbico una reducción significativa en el contenido de TRH se observó en la amígdala de animales sometidos a anorexia por deshidratación, mientras que en las que consumieron etanol se presentó una reducción significativa en la corteza frontal y un aumento en la corteza insular del contenido de TRH. Por lo que concluimos que en los modelos de anorexia disminuyó la ingesta de alimentos de manera voluntaria, presentándose la activación del eje tiroideo con la constante liberación de TRH. En los grupos de restricción alimentaria, se presentó adaptación del eje tiroideo, llevando a la reducción de la tasa metabólica y la reducción de la liberación de TRH. El hipocampo es la única región límbica donde se observó un efecto específico de la deshidratación, ya que provocó la inhibición de la actividad de neuronas TRHérgicas, sugiriendo así la participación de TRH de esta región en el control de la conducta alimentaria. El consumo de una solución de etanol provocó cambios específicos sobre neuronas TRHérgicas en la corteza frontal y la corteza insular, implicando así a TRH en funciones cognitivas y sobre el reconocimiento de sabores novedosos, respectivamente.

1. Introducción.

1.1. Ingesta de alimentos y homeostasis.

La ingestión de alimentos o conducta alimentaria es un comportamiento que tiene la función primaria de mantener las reservas de energía para satisfacer las continuas demandas del cuerpo (Woods y Stricker, 1999) y se encuentra influenciada por diversos factores culturales, sociales y biológicos (Blundell, 1993); es una actividad compleja compuesta de procesos somatosensoriales, motores, emocionales, cognitivos, de aprendizaje y de memoria, así como de aspectos autonómicos relacionados con el consumo de alimentos como son los que llevan a cambios en el tamaño de las reservas energéticas o al incremento en la absorción del tracto gastrointestinal (Berthoud, 2002; Morris y Dolan, 2001).

1.1.1. Etapas de la conducta alimentaria.

El *inicio* de la conducta alimentaria es una etapa en la que la atención de los animales se enfoca en los alimentos, ésta puede tener lugar por la presencia de un estímulo visual de un alimento o cualquiera otra de sus características sensoriales, tales como son la temperatura o el olor (Critchley *et al.*, 1993; Critchley y Rolls, 1996; Le Magnen 1992), o bien, por un estado endógeno independiente de la presencia del objeto comestible, lo que implica que existen representaciones de los alimentos en la memoria de los animales y por lo tanto están involucrados procesos cognitivos (Kupferman y Kandell, 1995; Tracy *et al.*, 2001). La *búsqueda*, es otra etapa de la conducta alimentaria en la que los individuos y los animales se encaminan a encontrar alimentos y está conformada por procesos de planeación, aprendizaje y memoria previos a la ingestión de los alimentos (Bechara *et al.*, 1999; Cardinal *et al.*, 2002; Jequier y Tappy, 1999). El *consumo*, es la etapa en la que se ingiere el alimento, se acompaña de procesos cognitivos a través de los cuales se comparan las características del alimento actual con las representaciones de éste cuando fue consumido con anterioridad (Le Magnen, 1992; Morris y Dolan, 2001). La *terminación*, es la etapa en la que la mayoría de los animales (excepto el hombre), una vez saciados dejan de consumir alimentos, involucra procesos digestivos, absortivos y post-absortivos que darán origen a

señales que informan al cerebro sobre el tipo de macronutrimiento que fue consumido, de la distensión gástrica, y de hormonas que son liberadas como respuesta a la presencia de metabolitos de diferentes compuestos de los alimentos (Landsberg y Young, 1993; Le Magnen, 1992).

Actualmente se han identificado vías neuronales, neurotransmisores, neuropéptidos y conexiones entre diferentes regiones cerebrales involucradas en el control de la conducta alimentaria (Berthoud, 2002; Cupples, 2003; Havel, 2001); sin embargo, si bien la conducta es afectada por la concentración, recambio, síntesis, liberación, etc. de un neurotransmisor en un circuito definido, también es cierto que una sola vía peptidérgica o de un neurotransmisor no es un factor absoluto para la aparición de una conducta.

1.1.2. Hipotálamo como centro regulador de la homeostasis y el papel del sistema límbico en el control de la conducta alimentaria.

La homeostasis se define como un estado de equilibrio entre los diferentes procesos que se desarrollan dentro de los seres vivos. La homeostasis entre la ingestión de comida y el gasto de energía está regulada a través de diferentes señales interconectadas (Havel, 2001), reconociéndose al hipotálamo como el centro integrador de estas señales (Havel, 2001; Kalra *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2000) ya sean periféricas (como la temperatura de los alimentos, la distensión gástrica, la concentración de glucosa e insulina) o aquellas relacionadas con la composición de nutrimentos (carbohidratos, grasas y proteínas) y con el peso corporal de cada individuo, las cuales también tienen un papel importante en el balance de energía (Jequier y Tappy, 1999) y que actúan sobre los diferentes núcleos que forman el hipotálamo. Un balance de energía negativo puede provocar diferentes respuestas en el sistema homeostático (Fig. 1) (Landsberg y Young, 1993; Schwartz *et al.*, 2000).

El hipotálamo juega un papel importante en el control de la ingestión de comida y en la percepción de la saciedad, ya que algunos de sus núcleos participan en el mantenimiento de

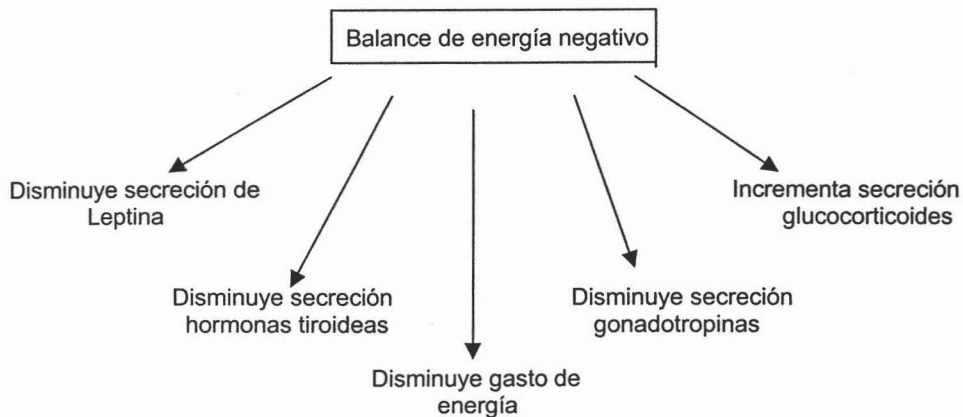


Fig. 1. Representación esquemática de diferentes respuestas a condiciones negativas en el balance energético.

la homeostasis energética del organismo y se encuentran conectados a mecanismos neuronales que afectan la conducta alimentaria (Kalra *et al.*, 1999). La presencia de diferentes neurotransmisores y péptidos orexigénicos y anorexigénicos, que estimulan o inhiben el consumo de alimentos, respectivamente (Fig. 2), así como la identificación de sus sitios de producción, liberación y unión, han reforzado la idea de la participación de éstos núcleos en la conducta alimentaria (Havel, 2001; Kalra *et al.*, 1999; Karydis y Tolis, 1998; Schwartz *et al.*, 1999; Zigman y Elmquist, 2003).

Entre los diferentes núcleos hipotalámicos (Fig. 3) se encuentra el *núcleo arcuato* (NArc) el cuál se encuentra fuera de la barrera hematoencefálica, contiene neuronas que sintetizan péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (NPY), opioides y anorexigénicos, como la hormona estimulante del α -melanocito (α MSH) (Berthoud, 2002; Cupples, 2003; Schwartz *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001), que en esta región es coproducido con β -endorfina (β -END) (Eipper y Mains, 1980; Smith y Funder, 1988); además este núcleo hipotalámico contiene receptores a leptina y las células que producen NPY junto con la proteína relacionada al agouti (AgRP), son inhibidas por concentraciones elevadas de leptina e insulina, mientras que las que producen pro-opiomelanocortina (POMC) y el transcrito regulador de cocaína y amfetamina (CART) son activadas (Broberger y Hokfelt, 2001; Schwartz *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001). Las neuronas del NArc proyectan a

varios sitios hipotalámicos como el núcleo ventromedial (NVM), núcleo dorsomedial (NDM) hipotálamo perifornical (HPF), núcleo paraventricular (NPV) y el área preóptica

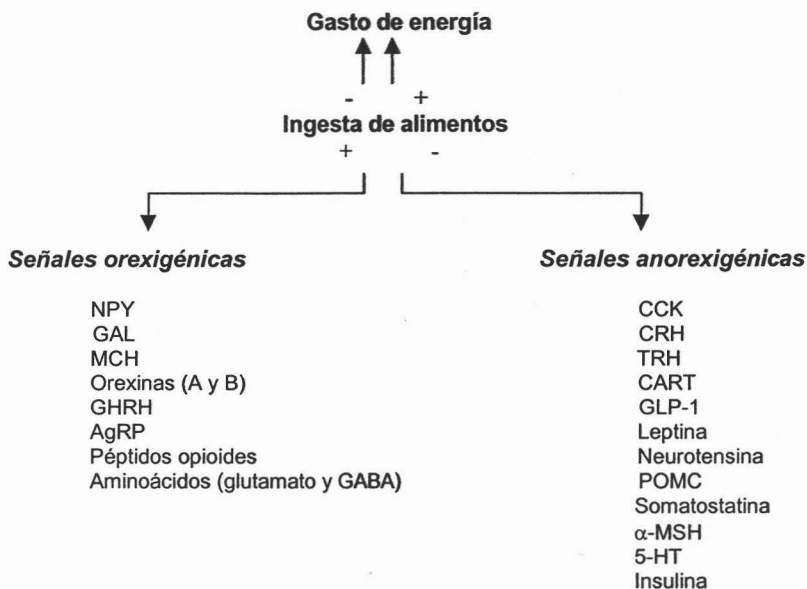


Fig. 2. Señales orexigénicas y anorexigénicas involucradas en la regulación del gasto de energía y la ingesta de alimentos.

(Broberger y Hokfelt, 2001; Kalra *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001). El *hipotálamo lateral* (HL) contiene neuronas que sintetizan orexinas, MCH y glutamato (Bittencourt *et al.*, 1992; de Lecea *et al.*, 1996); tiene proyecciones que conectan hacia la amígdala, el hipocampo y también hacia el NPV (Berthoud, 2002; Broberger y Hokfelt, 2001; Williams *et al.*, 2001); lesiones en el HL disminuyen la ingestión de comida provocando así la pérdida de peso (Kupfermann y Schwartz, 1995; Steward, 2000; Woods y Stricker, 1999). El *núcleo ventromedial* (NVM) del hipotálamo presenta receptores para el ácido γ-aminobutírico (GABA) y a melanocortina (Backberg *et al.*, 2004; Mountjoy *et al.*, 1994); tiene conexiones con el NPV, HL y el hipotálamo dorsomedial (Williams *et al.*, 2001) y gran abundancia de receptores a leptina (Meister *et al.*, 1989); lesiones en el NVM incrementan la ingesta de alimentos y

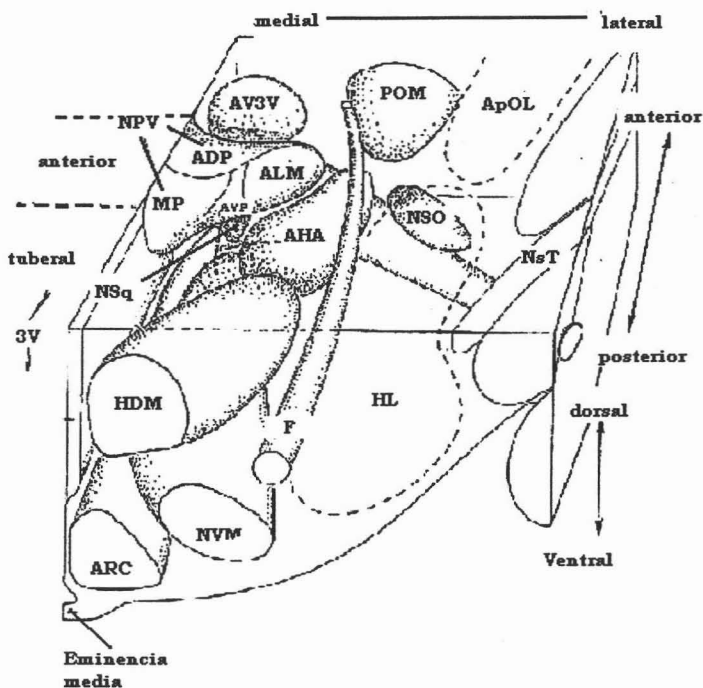


Fig. 3. Vista tridimensional del hipotálamo de rata. Hemisferio derecho del hipotálamo de rata; ver abreviaturas en índice.

llevan a la obesidad (Kupfermann y Schwartz, 1995; Steward, 2000; Woods y Stricker, 1999). El *núcleo paraventricular* (NPV) contiene péptidos básicamente anorexigénicos tales como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Berthoud, 2002; Krahn *et al.*, 1988; Zigman y Elmquist, 2003); la gran mayoría de sus fibras neuronales son GABAérgicas (Tasker y Dudek, 1993). El *hipotálamo dorsomedial* (HDM) presenta una pequeña población de neuronas que expresan al orexigénico NPY (Lewis *et al.*, 1993) y altas cantidades del receptor al anorexigénico colecistoquinina (CCK), así como receptores de insulina y leptina (Broberguer y Hokfelt, 2001; Williams *et al.*, 2001); además este núcleo hipotalámico, como el NVM, presenta conexiones con el NPV y el HL (Kalra *et al.* 1999).

Dependiendo de las necesidades energéticas de los individuos, la síntesis y la liberación de los péptidos orexigénicos y anorexigénicos cambia, llevando a reacciones homeostáticas en el hipotálamo que restauran el balance de energía y el peso corporal. Así durante el día, con el cambio de estaciones, en las diferentes etapas del desarrollo, el estado fisiológico, el estrés y dependiendo de la disponibilidad de nutrimentos, etc., se activan o inhiben diferentes vías peptidérgicas en las regiones cerebrales involucradas en el control de la conducta alimentaria, del peso corporal y del gasto de energía (Berthoud, 2002; Ueta *et al.*, 2003). En situaciones de baja disponibilidad de nutrimentos o de un excesivo gasto de energía, la concentración en sangre de señales anorexigénicas como leptina e insulina disminuyen y en el cerebro las neuronas blanco de estas hormonas que sintetizan péptidos anorexigénicos se inhiben, mientras que se activan las de péptidos orexigénicos estimulando el apetito, así como la búsqueda e ingestión de alimentos (Schwartz *et al.*, 1999; Zigman y Elmquist, 2003). Estas señales convergen en el NPV del hipotálamo y provienen de diferentes regiones periféricas y centrales.

En la regulación de la conducta alimentaria además del hipotálamo, diferentes regiones del sistema límbico (Fig. 4) se encuentran implicadas, este sistema juega un papel importante para controlar procesos emocionales. Regiones del sistema límbico como la amígdala participan dando un valor emocional al consumo de alimentos (Kesner *et al.*, 1989; Uwano *et al.*, 1995). La memoria de procesos de aprendizaje y aspectos motivacionales relacionados con el consumo de alimentos forman parte de las tareas del hipocampo (Kupferman y Kandell, 1995); también la participación de regiones como la corteza frontal, orbitofrontal y olfatoria involucran mecanismos cognitivos de procesamiento y asociación de características sensoriales de los alimentos (Morris y Dolan, 2001; Nishijo *et al.*, 2000; Rolls, 2000). Además los mecanismos de reforzamiento positivo o negativo para el consumo de un objeto comestible subyacen en el núcleo accumbens (Carelli *et al.*, 2000) y el reconocimiento de sabores novedosos en regiones como la corteza insular (Rosenblum, 1995, 1993).

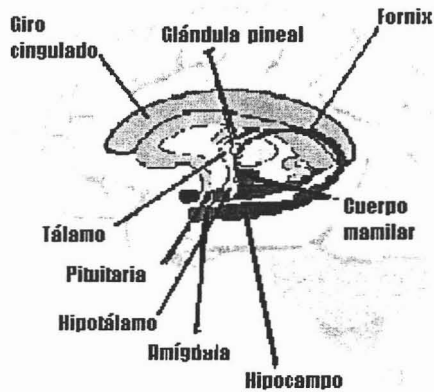


Fig. 4. Sistema límbico

Uno de los péptidos responsable de la regulación de la tasa metabólica y del gasto de las reservas energéticas, así como también ampliamente implicado en diferentes funciones en el SNC como antidepresivo, antiepiléptico y anorexigénico (Kubek *et al.*, 1993; Griffiths, 1987; Gary *et al.*, 2003) es el TRH (hormona liberadora de tirotropina) del NPV; células que sintetizan y liberan este péptido podrían ser el blanco de diferentes señales que se encuentran implicadas en diferentes aspectos de la conducta alimentaria.

1.2. Hormona liberadora de tirotropina (TRH).

La hormona liberadora de la tirotropina (TRH) del hipotálamo de porcino fue el primer factor de liberación hipotalámico purificado por Boler *et al.*, (1969) y Burgus *et al.*, (1969). De manera independiente ambos grupos de trabajo encontraron que TRH es un tripéptido pyroGlu-His-ProNH₂, bloqueado en su extremo amino por el anillo piro del ácido glutámico y en el extremo carboxilo por una amida (Fig. 5).

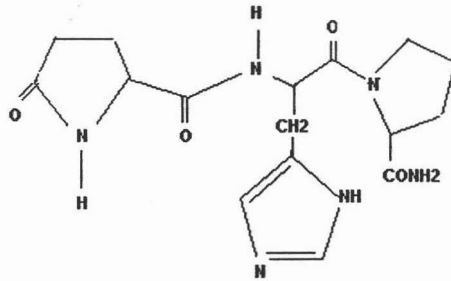


Fig. 5. Estructura de la hormona de liberación de tiotropina (TRH).

1.2.1. Biosíntesis.

La biosíntesis de TRH se lleva a cabo en el NPV. El TRH como otros factores de liberación hipotalámicos, surge del procesamiento post-traducciona de una larga proteína precursora denominada pro-TRH, mientras es transportado de la red trans-Golgi para formar parte de gránulos de secreción; estos gránulos maduros se dirigen a sitios de secreción de la membrana plasmática de la célula (Nillni y Sevarino, 1999). En la rata, el prepro-TRH es un polipéptido de aproximadamente 29 KDa compuesto de 225 aminoácidos (Fig.6); contiene cinco copias de la secuencia Gln-His-Pro-Gly, flanqueadas por pares de residuos

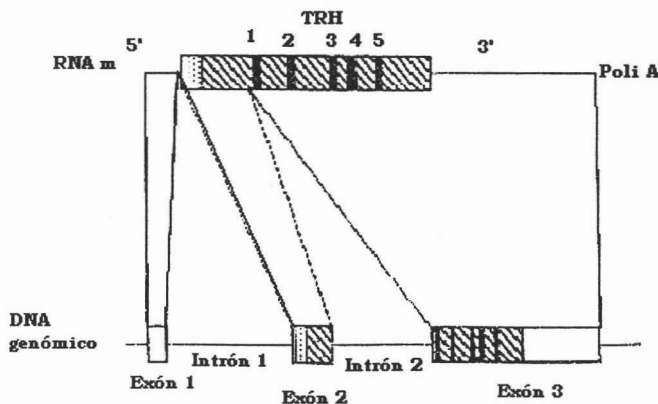


Fig. 6. Estructura esquemática del gen prepro-TRH en rata.

aminoácidos básicos, de modo que después del procesamiento del precursor además de TRH resultan siete péptidos (no TRH) intermedios (Nillni y Sevarino, 1999; O’Leary y O’Connor, 1995); entre ellos se encuentra el ppTRH₁₇₈₋₁₉₉, el cuál cuando es administrado por vía intravenosa provoca la disminución de los niveles de corticotropina (ACTH), corticosterona y prolactina en ratas (Suzuki *et al.*, 2001) y el ppTRH₁₆₀₋₁₆₉, que es el péptido derivado mejor caracterizado y que tiene funciones hipofisiotrópicas, ya que su administración aumenta la liberación de TSH. Por medio de la acción de las enzimas prohormona convertasa (PC) 1 y 2 (PC1y PC2) en los residuos básicos, se genera el TRH biológicamente activo, seguido por la acción de carboxipeptidasas (CPE), las cuales eliminan estos residuos (Nillni y Sevarino, 1999; Suzuki *et al.*, 2001) para luego ser modificado por la enzima glicina α -amidante monooxigenasa (PAM) y la glutaminilciclasa para dar así a la formación del péptido TRH, biológicamente activo (Joseph-Bravo *et al.*, 1993) (Fig. 7).

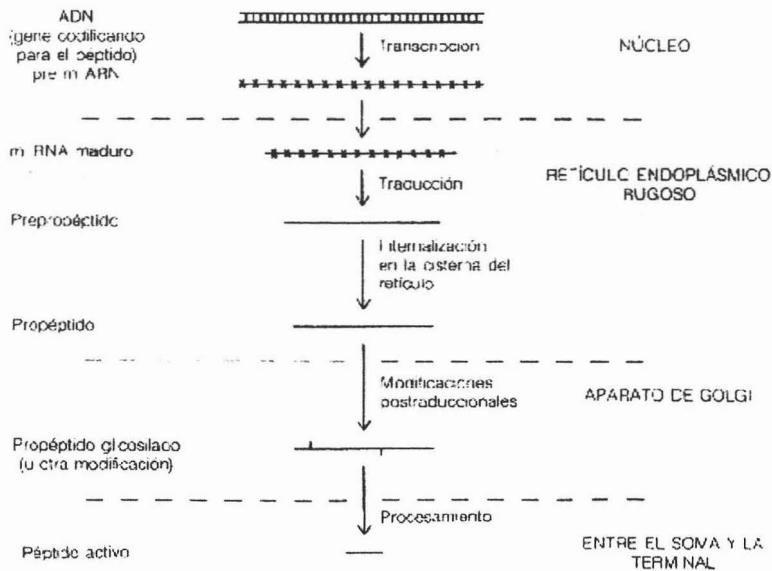


Fig. 7. Biosíntesis de péptidos.

1.2.2. Distribución.

Por medio de técnicas de radioinmunoreactividad se ha encontrado actividad del TRH ampliamente distribuida en el SNC, cerebro y tracto gastrointestinal de especies mamíferas (O'Leary y O'Connor, 1995).

En el cerebro la mayor concentración de TRH es encontrada en el hipotálamo (Fuse *et al.*, 1990; O'Leary y O'Connor, 1995); está presente en grandes cantidades en terminales neuronales del núcleo paraventricular (NPV) que proyecta a la eminencia media (EM) formando así el sistema tuberoinfundibular y donde TRH es liberado (Strand, 1999).

Fuera del NPV, el TRH se encuentra en el núcleo dorsomedial, en el hipotálamo lateral y el área preóptica, los núcleos mediales, periventriculares y supraquiasmáticos (Mendez *et al.*, 1987; Nillni y Sevarino, 1999), así como en el núcleo del rafé (Gary *et al.*, 2003). El TRH extrahipotalámico, equivalente al 70% del total de TRH, se ha encontrado en estructuras del sistema límbico como la amígdala, el núcleo accumbens y el bulbo olfatorio, así como también en el mesencéfalo, la médula oblonga y en la región cervical de la médula espinal (Mendez *et al.*, 1987; Strand, 1999). Por medio de la técnica de radioinmunoensayo Low *et al.* (1989) han identificado en el hipocampo, gran cantidad de TRH, siendo mayor en la región CA3, seguido por la región CA1 y el giro dentado, en el subículo con los niveles más bajos; el hipocampo ventral contiene mayor cantidad de TRH que el hipocampo dorsal. El TRH está presente en el tracto gastrointestinal y en pocas cantidades en otros sitios como la placenta (Shambaugh *et al.* 1979; Strand, 1999) y en el páncreas (Hokfelt *et al.*, 1989).

Debido a su distribución, TRH puede coexistir con otros péptidos y/o neurotransmisores como la sustancia P (SP) y la serotonina (5-HT) (en la medula espinal), la hormona del crecimiento (en el lóbulo anterior de la pituitaria) (Lechan *et al.*, 1983), con el transcrito regulador de cocaína y anfetamina (CART) (Raptis *et al.*, 2004), la galanina y la somatostatina (Hokfelt *et al.*, 1989; Lechan *et al.*, 1983; Strand, 1999).

1.2.3. Funciones, receptores y degradación de TRH.

Las terminales de los axones cuyos núcleos forman el NPV del hipotálamo forman la eminencia media donde se almacenan péptidos ya procesados y maduros listos para ser liberados hacia el sistema portal; así, TRH al ser liberado en respuesta a un estímulo despolarizante, entra en contacto con células adenohipofisarias.

En su papel como hormona *hipofisiotrópica*, el TRH induce la síntesis y la liberación de tirotropina (TSH) a través de la acción sobre su receptor localizado en la adenohipófisis quien a su vez activa la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) (Akil *et al.*, 1999). El eje hipotalamo-hipofisis-tiroideo (HHT) mantiene un nivel constante de hormonas tiroideas (HT) libres en el torrente sanguíneo por un sistema de retroalimentación negativa (Fig. 8): cuando la concentración de HT aumenta, se inhibe la biosíntesis de TSH en la adenohipófisis y también disminuye la síntesis y liberación de TRH del NPV; en cambio, en el hipotiroidismo, cuando la concentración de HT disminuye, aumenta tanto la transcripción como la traducción de pro-TRH en el NPV (Demeester-Mirkine y Dumont, 1980; Dahl *et al.*, 1994; Kakucsá *et al.*, 1992; Segerson *et al.*, 1987).

El TRH es resistente a la acción de exopeptidasas, así como, a la degradación por endopeptidasas generales debido a su fracción interna de prolina (O'Leary y O'Connor, 1995). Las enzimas específicas que actúan sobre TRH se encuentran en el cerebro, pituitaria, hígado, riñón, páncreas, glándulas adrenales y la sangre (Nillni y Sevarino, 1999). La única enzima que degrada a TRH liberado de la eminencia media *in vivo* es la piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) que se encuentra en membranas celulares de la adenohipófisis (Fig. 9); su sitio activo se encuentra en el espacio extracelular, removiendo el residuo pGlu de TRH solo cuando es liberado y mostrando así un alto grado de especificidad para TRH (Charli *et al.*, 1988, 1993; Bauer, 1995; O'Connor y O'Cuinn, 1984; Vargas *et al.*, 1992).

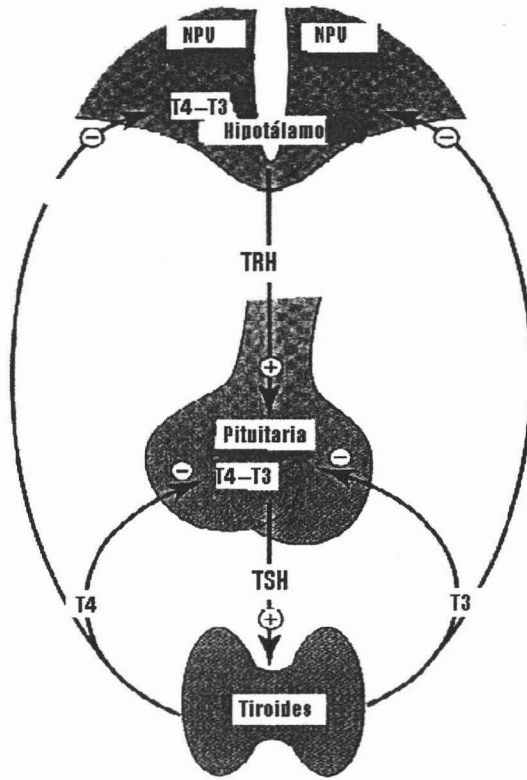


Fig. 8.Regulación del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT)

En suero la enzima que se encarga de degradar TRH es la tiroliberinasa, la cual presenta propiedades similares a PPII (Bauer *et al.* 1981; Bauer, 1988; Taylor y Dixon, 1978); además la actividad de esta enzima se encuentra correlacionada con el IMC en pacientes obesos (Friedman *et al.*, 1995).

Además de sus funciones hipofisiotrópicas, el TRH funciona como *neuromodulador* de algunos neurotransmisores (Hokfelt *et al.*, 1989). La importancia de los efectos de TRH en el SNC se corrobora con su presencia en regiones del cerebro junto con los sitios de unión a sus receptores. Manaker *et al.* (1985) por medio de autoradiografía cuantitativa identificó elevadas concentraciones de receptores de TRH en rinencéfalo, incluyendo bulbo olfatorio, núcleo de la amígdala y el giro dentado ventral, así como en el subículo del hipocampo

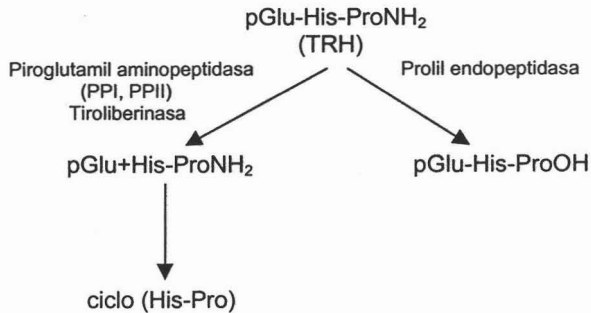


Fig. 9. Degradación de TRH por diferentes enzimas

siendo en la neocorteza y en los ganglios basales donde se encuentran las concentraciones más bajas de receptores de TRH. La presencia de mayor densidad de receptores a TRH en algunas regiones como el núcleo accumbens y la amígdala, se relaciona con los efectos del TRH en algunos trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia (Otake y Nakamura, 2000).

Se han caracterizado dos receptores para TRH: TRH R1 y TRH R2. *TRH-R1*: la estructura del receptor humano es 90.3% homóloga a la del ratón y 89.2% al de la rata; se encuentra predominantemente expresado en regiones hipotalámicas, en la pituitaria anterior, así como en el bulbo olfatorio y también en varios núcleos del tallo cerebral y motoneuronas de la médula espinal (Heuer, 2000; Cao *et al.*, 1998; Sharif y Burt, 1985). La proteína que codifica para *TRH-R2* es de 352 amino ácidos la cual muestra una similitud del 68% con TRH-R1 y regula el flujo de calcio una vez que se une a TRH (Cao *et al.*, 1998; O'Dowd *et al.*, 2000). TRH-R2 se encuentra involucrado en funciones como el control motor y transmisión somatosensorial debido a que su RNAm se encuentra ampliamente distribuido con elevados niveles de su transcrito en el tálamo, la corteza cerebral, el núcleo pontino, el núcleo geniculado medial y el cerebelo; en la médula espinal se detectó exclusivamente dentro del asta dorsal (Cao *et al.*, 1998; Heuer, 2000; O'Dowd *et al.*, 2000).

García *et al.* (1997) reporta que el aumento en la expresión del precursor de TRH en áreas alrededor del tercer ventrículo en ratas, provoca elevación de la presión arterial. La aplicación de una inyección intracerebroventricular de TRH o alguno de sus análogos antagonizan los efectos de sedación, depresión locomotora e hipotermia que provoca el

etanol (Cott *et al.*, 1976; Morzorati y Kubek, 1993) y drogas como el pentobarbital (Bresse *et al.*, 1975; Mori *et al.*, 1986), mientras que Breese *et al.* (1984) encuentran en ratas que la administración de TRH combinado al mismo tiempo con etanol aumentan la actividad locomotora. La inyección subcutánea de TRH provoca a corto plazo disminución de la ingesta de comida y agua, así como aumento en la temperatura corporal (Choi *et al.*, 2002); por medio de un análogo de TRH se aumenta la motilidad gástrica en ratas (Yang *et al.*, 2000), efecto que también se ha observado en conejos y gatos (Tache *et al.*, 1989). Kalivas *et al.* (1987) observan que después de inyección de TRH en el núcleo accumbens y en los ventrículos laterales se aumenta el metabolismo y la liberación de dopamina (DA); TRH puede restablecer funciones de memoria y aprendizaje provocados por lesiones o tratamientos anticolinérgicos en ratas (Nillni y Sevarino, 1999). TRH se encuentra involucrado en la conducta de hibernación (sueño/despertar) (Bennett *et al.*, 1986; Riel *et al.*, 2000; Thompson y Rosen, 2000). Además, se ha propuesto que TRH tiene funciones antiepilépticas (Kubek *et al.*, 1993, Morimoto *et al.*, 1983) y algunos de sus análogos tienen funciones antidepressivas (Griffiths, 1987; Lloyd *et al.*, 2001; Sattin *et al.*, 1994; Sattin *et al.*, 1999), en pacientes depresivos se ha encontrado aumento de TRH en el fluido cerebroespinal (Bahls y Amaral de Carvalho, 2004; Musselman y Nemeroff, 1996).

Debido a que el TRH ha sido implicado en la patofisiología de diferentes enfermedades como son la esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, así como en desórdenes tiroideos, anorexia nervosa y otros desórdenes endócrinos (Gary *et al.*, 2003; O'Leary y O'Connor, 1995), la variedad de efectos fisiológicos y del comportamiento que produce TRH proveen una base para considerar su aplicación con fines terapéuticos (Gary *et al.*, 2003).

1.2.4. Regulación del metabolismo de TRH.

1.2.4.1. Eje tiroideo durante ayuno y desnutrición.

El funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) (Fig. 8) controlado por un sistema de retroalimentación negativa como mencionamos anteriormente, sufre adaptaciones dependiendo de los cambios en las necesidades energéticas de los individuos.

Así, la restricción alimentaria, el ayuno y la desnutrición llevan a adaptaciones en las que la concentración de HT disminuyen (Blake *et al.*, 1991; Van Haasteren *et al.*, 1996; Rondell *et al.*, 1992) al mismo tiempo que se reduce la concentración de hormonas como leptina e insulina (Seoane *et al.*, 2000). Además, la función del eje HPT se regula de manera diferencial por la edad; ratas adultas sometidas a 48 horas de ayuno, presentan disminución en los niveles de TSH en suero y aumento de TRH en la eminencia media, a diferencia de las ratas infantiles, en las cuales no se observan estos cambios bajo esta misma condición (de Gortari *et al.*, 2000a); además, en ratas adultas sometidas a ayuno por 3 días, disminuyen los niveles de hormonas tiroideas T₃ y T₄ (Légrádi *et al.*, 1997).

1.2.4.2. Glucocorticoides.

Los glucocorticoides adrenales representan el producto final de la activación del eje hipotalámico-pituitario adrenal (HPA), son los mayores reguladores del metabolismo de carbohidratos y lípidos, importantes en la homeostasis y en las respuestas a condiciones de estrés. El eje HPA es sensible a la retroalimentación negativa (O'Connor *et al.*, 2000). Los glucocorticoides provocan diferentes respuestas ya sea estimulantes o inhibitorias sobre la transcripción de genes, ejerciendo reacciones ya sea al nivel post-transcripción, al nivel traducción y/o post-traducción (Nillni y Sevarino, 1999).

Los glucocorticoides inducen cambios en la biosíntesis y el procesamiento de pro-TRH del NPV afectando su transcripción o traducción; en animales adrenalectomizados se presenta mayor cantidad de RNAm de pro-TRH y RNAm de pro-CRH en el NPV, mientras que con la administración oral de corticosterona, bajo estas condiciones, se observa una reacción contraria, donde los niveles de RNAm de pro-TRH y RNAm de pro-CRH en el NPV disminuyen (Kakucsá *et al.*, 1995). La dexametasona un corticosteroide exógeno, administrado en pacientes sanos provoca un efecto inhibitor en la secreción de TSH y en los niveles libres de T₃ (Rupprecht *et al.*, 1989). Este mismo efecto de la administración de dexametasona se observa en pacientes depresivos (Maes *et al.*, 1990).

1.2.4.3. Leptina

La leptina es una hormona peptídica que es sintetizada y liberada por el tejido adiposo. En la conducta alimentaria, se ha observado que la administración aguda de leptina disminuye la ingesta de comida e induce la pérdida de peso en roedores, llega por vía sanguínea al SNC, donde actúa sobre los centros hipotalámicos; sus concentraciones circulantes se correlacionan con las cantidades de grasa corporal tanto en humanos como en animales (Havel, 2001; Houseknecht *et al.*, 1998; Jéquier y Tappy, 1999; Ostlund *et al.*, 1996).

Análisis inmunocitoquímicos revelan que aproximadamente del 40% al 50% de las células hipotalámicas son positivas al receptor de leptina y de éstas en el 15% se colocalizan con TRH, por lo tanto la leptina puede actuar directamente sobre neuronas TRHérgicas. Nillni *et al.* (2000), utilizando como modelo cultivos celulares de neuronas hipotalámicas de fetos de rata, demostraron que dependiendo de la dosis la leptina puede estimular el aumento de prepro-TRH, pro-TRH y la secreción de TRH. Légrádi *et al.* (1997) encuentran que la administración sistémica de leptina en ratas sometidas a ayuno por 3 días, previene la reducción de RNAm de pro-TRH en el PVN provocada por el ayuno (Blake *et al.*, 1991); mientras que Ortiga-Carvalho *et al.* (2002) encuentran en ratas adultas que después de una inyección de leptina hay un efecto estimulador en la liberación de TSH, a nivel hipotalámico. La leptina puede regular la biosíntesis de TRH a nivel post-traducción a través de cambios en el procesamiento de pro-TRH, por medio de la estimulación o el aumento del RNAm de las enzimas PC1 y PC2 (Sánchez *et al.*, 2004).

De manera indirecta la leptina también regula la expresión de TRH. Se han encontrado evidencias de proyecciones de neuronas del NArc a neuronas TRHérgicas (Légrádi y Lechan, 1998), así como a terminales axónicas de α -MSH y AgRP cercanas a las células que sintetizan TRH y en dendritas del NPV (Fekete *et al.*, 2000; Mihály *et al.*, 2000). Actuando indirectamente en neuronas del NArc, la leptina regula la expresión de POMC y de α -MSH, inhibiendo a NPY y a la AgRP, provocando posteriormente efecto sobre los receptores de melanocortina (MC4Rs), los cuáles se encuentran también en neuronas

TRHérgicas del NPV, regulando así la expresión de TRH (Harris *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2000).

1.2.4.4. NPY y AgRP.

Fekete *et al.* (2001) encuentran que la inyección intracerebroventricular de NPY en ratas, reduce los niveles circulantes de hormonas tiroideas (T_3 y T_4), provocando así un estado de hipotiroidismo, así como también disminuyen los niveles de TSH, estos cambios se encuentran asociados con la inhibición de RNAm de pro-TRH en el NPV; resultados similares se encuentran con la aplicación intracerebroventricular de la AgRP, la cual es también una señal orexigénica (Fekete *et al.*, 2002).

1.3. Anorexia nervosa.

La anorexia nerviosa (AN) es un trastorno alimentario producido por una compleja interacción de factores tanto emocionales, genéticos o biológicos y culturales; se caracteriza por un grave déficit de energía que puede ser un reflejo de la falta de apetito; este trastorno deriva en múltiples cambios endócrinos y metabólicos. Además, se asocia con frecuencia a otros tipos de trastornos psiquiátricos que contribuyen al origen o al mantenimiento del problema como son la depresión, las fobias, la ansiedad y trastornos obsesivo-compulsivos;. (Beato *et al.*, 1999; Jonson *et al.*, 2002; Kaye, 1997; Steinhausen, 2002; Treasure, 2003). En el DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition) se presentan los criterios más representativos para el diagnóstico de este trastorno (Tabla 1); especificando dos tipos: el *restrictivo*, en el cual el individuo no recurre regularmente a atracones o purgas, y el tipo *compulsivo/purgativo*, en el cual el individuo recurre regularmente a atracones o purgas (ej. provocación del vómito o uso excesivo de laxantes o diuréticos).

Diferentes líneas de investigación apoyan la existencia de un componente genético en el desarrollo de la anorexia nervosa, con un grupo de rasgos de la personalidad y del comportamiento muy característicos del trastorno (Halmi, 2003); algunos estudios en

gemelos ponen de manifiesto el riesgo de heredabilidad con cifras del 54-80% (Connan *et al.*, 2003; Halmi, 2003). En ratas gestantes la exposición a factores estresantes como la desnutrición, pueden provocar daños en el feto que a largo plazo se expresarían en fallas en

DSM-IV Criterios para el diagnóstico de la anorexia nervosa
Rechazo a mantener el peso corporal igual o por encima del valor mínimo normal considerando la edad y talla
Miedo intenso a ganar peso o a convertirse en obeso, incluso estando por debajo del peso normal
Alteración de la percepción del peso o la silueta corporales, exageración de su importancia en la autoevaluación o negación del peligro que comporta el bajo peso corporal
En las mujeres pos-puberales presencia de amenorrea, ausencia de al menos tres ciclos menstruales consecutivos
Se describen dos sub-tipos. Restrictivo y compulsivo/purgativo

Tabla 1. Características presentes en personas que presentan anorexia nerviosa según el DSM-IV.

algunas vías metabólicas; Lesage *et al.* (2001) encuentran que en ratas sometidas a restricción alimentaria durante la última semana de gestación, presentan retardo en el crecimiento intrauterino y bajo peso corporal al nacer, así como daños en el eje HPA, expresados con el bajo peso de la glándula adrenal.

Los pacientes que padecen anorexia nervosa son por lo general personas autoexigentes, presentan mayor tendencia a la hostilidad y a la ansiedad, también se encuentran presentes la baja autoestima y el perfeccionismo, además de inhibición social; estos pacientes suelen presentar antecedentes de obesidad en mayor o menor grado (Connan *et al.*, 2003; Vaz, 2003). Particularmente este trastorno alimentario aparece en la adolescencia, etapa en la cual se presentan cambios profundos de aspecto psicológico, biológico y sociocultural (Borrego, 2000) y que se acompaña además, de desarrollo cerebral (como la mielinización y la sinaptogénesis) principalmente en regiones límbicas y frontales (Connan *et al.*, 2003), observándose así el aumento en las funciones cognitivas durante esta etapa (Spear, 2000). Previo al inicio de la pubertad se observa ganancia de peso, la cual se asocia con el aumento en los niveles circulantes de leptina (Carballo *et al.*, 1999; Muñoz y Argente, 2002); además el aumento en la producción de hormonas adrenales, es también asociado a cambios en el peso corporal y en las reservas de grasa (Connan *et al.*, 2003; Spear, 2000).

Dimorfismo sexual en la anorexia se atribuye principalmente a que en mujeres, el aumento en los niveles de estrógenos, regulan la función serotoninérgica, lo que provoca que se altere el número de receptores a 5-HT o su síntesis, o también regulando a CRH, por medio de receptores a mineralocorticoides hipocámpales (Carey *et al.*, 1995; Rubinow *et al.*, 1998).

Pacientes con anorexia presentan regularmente anemia, atrofia de piel y de mucosas, así como también estreñimiento (Bousoño, 2003). Las personas que padecen este trastorno pierden del 15% al 60% de su peso corporal normal, con una disminución en la ingesta calórica lo que lleva como consecuencia a alteraciones metabólicas, endócrinas y conductuales (Borrego, 2000, Eckert *et al.*, 1998; Toro, 1998). Estas pueden desencadenar problemas como la disminución en las concentraciones de leptina que coincide con índices de masa corporal (IMC) bajos (Argente, 1999; Boden *et al.*, 1996; Bousoño, 2003; Grinspoon *et al.*, 1996; Ostlund *et al.*, 1996; Pannacciulli *et al.*, 2003; Smiarowska, 2002) y que puede presentarse al mismo tiempo con actividad física elevada (Holtkamp *et al.*, 2003). En estas condiciones se puede afectar la función del eje hipotálamico-pituitario-tiroideo (HPT), provocando adaptación metabólica y endócrina que puede derivar en cambios en los niveles de glucosa e insulina plasmáticas (Nozaki *et al.*, 1994), así como aumento en la producción de cortisol (Walsh *et al.*, 1978, Smiarowska, 2002), baja concentración de hormonas tiroideas (T3 y T4) (Croxson e Ibbertson, 1977; Miyai *et al.*, 1975), aumento de arginina vasopresina en fluido cerebroespinal (Gold *et al.*, 1983) y elevado acetoacetato (Pirke y Phillip, 1993), disminución de la síntesis de grasas, y en mujeres hay, ausencia de menstruación (amenorrea) y desinterés sexual (Alemany, 2003).

1.4.1. Modelos animales de estudio en anorexia.

Entre los diferentes modelos animales de investigación de anorexia, basados en perfiles clínicos de la enfermedad, se encuentran aquellos que son por dietas de restricción, estrés por separación [separando a las crías de sus madres (Hao *et al.*, 2001; Siegfried *et al.*, 2003)] y actividad física (Siegfried *et al.*, 2003).

La *anorexia por deshidratación* (Watts *et al.*, 1999) es un modelo que se ha utilizado para estudiar, en ratas, este trastorno de la alimentación. Este modelo consiste en proporcionar a los animales una solución salina al 2.5% durante un tiempo determinado; el consumo de esta solución provoca que las ratas disminuyan el consumo de alimentos de manera voluntaria. Ratas sometidas a este modelo experimental presentan cambios similares a los observados durante el ayuno y la restricción alimentaria como son la pérdida de peso corporal, incremento de la concentración de glucocorticoides y cambios metabólicos como la disminución de leptina e insulina; aunque estos cambios son similares, el consumo de alimentos es evitado de manera voluntaria por las ratas sometidas a este modelo de anorexia. Experimentos realizados en nuestro laboratorio empleando el modelo de anorexia por deshidratación, sugieren que TRH participa en el control de la conducta alimentaria ya que se observaron cambios, como el aumento en el contenido de TRH, en regiones cerebrales como la corteza insular y el hipotálamo. Además en ratas deshidratadas, a diferencia de ratas adultas sometidas a restricción alimentaria, presentaron diferente respuesta en la actividad del eje tiroideo (Jaimes, 2003), sugiriendo así que la anorexia por deshidratación provoca un retraso en las adaptaciones características que se dan en el ayuno y la restricción alimentaria. Ratas anoréxicas por deshidratación y ratas con restricción forzada de alimentos presentan un incremento en la concentración de RNAm de NPY en el núcleo arcuato y disminución de la concentración de RNAm de POMC y neurotensina (NT) en el núcleo arcuato. A diferencia de las ratas con restricción alimentaria forzada las ratas con anorexia presentan aumento en la concentración de RNAm de CRH en el HL (Watts *et al.*, 1999).

Además del modelo de anorexia por deshidratación, para comparar los cambios de TRH también, se empleará otro modelo de inducción de la anorexia, por medio del consumo de una solución de *etanol*. El consumo de *etanol* ha sido utilizado para evaluar las respuestas metabólicas del organismo con respecto a diferentes parámetros fisiológicos como por ejemplo el peso corporal; en experimentos previos en un grupo de ratas que consumieron una solución de *etanol* al 10% se registró, después de 4 semanas de tratamiento, pérdida de peso y aumento en el contenido de TRH en el septum (Nikodemova *et al.*, 1998); Zoeller *et al.* (1996) demuestra que una solución de chocolate líquido con *etanol* al 5% provoca

disminución de peso corporal al término de 4 semanas con respecto al control, así como un aumento en el RNAm de TRH en el NPV. Además, Piano *et al.* (2001) han demostrado que el consumo de una solución de etanol al 9% durante 16 días provoca disminución en el peso corporal. En nuestro laboratorio, el consumo de una solución al 20% también provoca disminución en la ingesta de alimento y del peso corporal en ratas gestantes y sus crías al término de 3 semanas de tratamiento, así como, también en ratas macho al término de 6 y 8 semanas de consumo de la solución de etanol (de Gortari *et al.*, 2002; de Gortari *et al.*, 2005); la ingestión de alcohol provoca disminución en el contenido de TRH en regiones límbicas como la amígdala, núcleo accumbens y la corteza frontal, áreas cerebrales involucradas en la conducta alimentaria (Jaimes, 2003).

2. Justificación.

Los trastornos de la alimentación son un problema grave que afecta a un creciente número de personas. La anorexia nervosa es uno de los trastornos de la alimentación que ha cobrado mayor importancia ya que su prevalencia es del 0.5–1.5% entre adolescentes y mujeres jóvenes principalmente (González *et al.*, 2003; Muñoz y Argente, 2002). Particularmente el inicio de este trastorno se presenta durante la etapa adolescente, después de someterse a dietas exageradas o drásticas (Collier y Treasure, 2004; Jonson *et al.*, 2002; Patton *et al.*, 1999).

La anorexia nervosa se encuentra asociada a trastornos del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT). En ratas adultas sometidas al modelo de anorexia por deshidratación se observa una respuesta diferencial del eje tiroideo con respecto a ratas sometidas a restricción alimentaria. Además, pacientes con anorexia nervosa presentan baja concentración de hormonas tiroideas (T3 y T4) (Croxson e Ibbertson, 1977; Miyai *et al.*, 1975), aumento en la producción de cortisol (Walsh *et al.*, 1978, Smiarowska, 2002) y, particularmente en mujeres, que presentan este trastorno, se observa amenorrea o ausencia de menstruación (Muñoz, 1998).

Además de que se ha implicado a TRH en trastornos como la depresión y la ansiedad (Lloyd *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2001), se ha reportado su participación como un agente anorexigénico ya que su administración central provoca disminución de la ingesta de alimentos en ratas (Karydis y Tolis, 1998; Choi *et al.*, 2002). Se sugiere que TRH puede participar en aspectos motivacionales en la conducta de ingesta ya que durante el ayuno neuronas TRHérgicas de la amígdala se activan en ratas adultas, mientras que en ratas infantiles la actividad se observa en el hipocampo y en núcleo accumbens (de Gortari *et al.*, 2000a). La actividad cerebral en regiones del sistema límbico se modifica de manera diferencial en pacientes con anorexia nervosa a diferencia de individuos sanos; ya que se observa actividad de la amígdala derecha en pacientes con este trastorno cuando se les confronta con su imagen corporal (Seeger *et al.*, 2002); así como, un aumento en la

activación de redes neuronales involucradas en procesar información visual-espacial y auto reflejo (Wagner, 2003).

Aunque se propone a TRH como anorexigénico (Choi *et al.*, 2002; Karydis y Tolis, 1998), no se conocen los cambios endógenos del contenido de TRH al someter a los animales (ratas púberes) a modelos de anorexia; por lo que los cambios diferenciales en el contenido de TRH del hipotálamo y de diferentes regiones del sistema límbico implicadas en la regulación de la conducta alimentaria (en modelos de anorexia y de restricción alimentaria forzada) permitirán involucrar la participación de TRH en aspectos relacionados a esta conducta.

3. Objetivos.

Objetivo general.

Definir la participación de TRH en la regulación de la conducta alimentaria de ratas adolescentes, aplicando modelos de anorexia y restricción forzada de alimentos.

Objetivos particulares.

- Evaluar y describir los cambios metabólicos en los modelos de anorexia, restricción forzada de alimentos y consumo de solución de glucosa.
- Evaluar y describir los cambios en el contenido de TRH hipotalámico, así como, también respuestas diferenciales del eje tiroideo en los modelos de anorexia, restricción alimentaria y consumo de solución de glucosa.
- Identificar la participación de TRH en el sistema límbico de ratas adolescentes en el control de la conducta alimentaria.

4. Hipótesis.

Cambios diferenciales en el contenido de TRH en diferentes modelos de anorexia, restricción alimentaria y consumo de solución de glucosa, nos definirán la participación de TRH como neuromodulador en la conducta alimentaria.

5. Materiales y métodos.

5.1. Animales

Se usaron ratas Wistar hembras del bioterio del Instituto Mexicano de Psiquiatría (IMP) con cinco semanas de nacidas (152 ± 0.21 g), las cuales fueron colocadas dentro de cajas individuales en un cuarto con ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h y temperatura controlada (22 °C). Se habituaron a las condiciones del bioterio durante siete días previos al inicio del experimento, con consumo de agua y alimento (Lab rodent diet 5001) *ad libitum*; se registró el peso diariamente para formar los grupos con peso homogéneo al comienzo del experimento (165 ± 3.5 g).

5.1.1.. Grupos experimentales.

Se formaron cinco grupos para valorar los efectos de diferentes modelos de anorexia y restricción alimentaria. La duración del experimento fue de cinco días, realizándose el sacrificio a la mañana siguiente; los grupos de restricción alimentaria fueron desfasados por un día para ofrecerles la misma cantidad de alimento que consumieron las ratas sometidas a los modelos de anorexia.

1. **Control** (control). n=12. Recibió agua y alimento *ad libitum*.
2. **Sal o deshidratadas** (sal). n=12. Recibió alimento *ad libitum* y una solución salina al 2.5% como única fuente de líquido.
3. **Pareado** (pareado a grupo sal). n=12. Recibió alimento en la misma cantidad que consumieron las ratas del grupo Sal (S) y agua *ad libitum*. El grupo estuvo desfasado por un día para poder registrar la cantidad de alimento que consumió el grupo Sal y así ofrecer la misma cantidad de alimento a éste grupo.
4. **Etanol** (etanol). n=12. Recibió alimento *ad libitum* y una solución de etanol al 20% como fuente de líquido.
5. **Glucosa**. (pareado a grupo etanol). n=12. Recibió la misma cantidad de alimento que consumieron las ratas del grupo etanol (E) y una solución isocalórica de glucosa

(147.68 kcal) con respecto a la solución del grupo etanol (E). El grupo estuvo desfasado por un día para poder registrar la cantidad de alimento y de solución que consumió el grupo etanol (E) y así ofrecer las mismas cantidades a éste grupo.

5.2. Experimento

Durante los cinco días de experimento se registró diariamente el peso de los animales en todos los grupos (09:30- 10:30), así como el consumo de alimento y de líquido (17:30- 18:30) para lo cual se restó la cantidad que las ratas dejaron de alimento o agua de la cantidad ofrecida el día anterior. Las cantidades ofrecidas por día de alimento y agua fueron de 40 g y 150 ml respectivamente.

El sacrificio se efectuó por decapitación entre las 10:00 y 11:30. Al momento del sacrificio se extrajeron los cerebros (para analizar la concentración de TRH por radioinmunoensayo), se almacenaron a -70 °C (ultracongelador Thermo Forma 8526) hasta su disección. Se colectó la sangre del tronco de los animales en tubos, los cuales posteriormente se centrifugaron para obtener el suero ($\approx 480 \mu\text{l}$) que fue utilizado para analizar las concentraciones de las hormonas leptina, tirotrópina y corticosterona, así como también medir la actividad enzimática de la tiro liberinasa.

5.3. Disecciones

Las disecciones de los cerebros se realizaron separando el hemisferio izquierdo del derecho. Se obtuvieron las siguientes regiones usando como referencia Atlas Palkovits de cerebro de rata (Palkovits, 1988): corteza frontal, amígdala, núcleo accumbens, hipotálamo, corteza insular, eminencia media e hipocampo para medir contenido de TRH por radioinmunoensayo. Se procura realizar la disección evitando que los cerebros se descongelen completamente; al momento de extraer cada una de las regiones, éstas se colocan en hielo seco y después mantener las disecciones a -70 °C, para el posterior análisis de cuantificación de TRH.

5.4. Extracción de TRH.

Se agregó a los tejidos congelados del hemisferio izquierdo de cada región 500 µl de ácido acético (Merck) al 20 %; se sonicó el tejido (Vibra-cell VC130) y se tomó una alícuota de 30 µl para cuantificar proteínas (Lowry, 1951). Se centrifugaron los tubos con el tejido homogeneizado a 14000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos a 4 °C (Centrífuga Eppendorf 5810 R); al sobrenadante se adicionó 800 µl de metanol (J.T. Baker) al 100%, se agitó (Daigger Vortex Genie 2) y se dejó a -20 °C durante la noche. Al día siguiente los tubos se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y el sobrenadante se secó en un concentrador con vacío (Eppendorf-Vacufuge 5301) durante aproximadamente tres horas, obteniéndose así el pellet para medir la concentración de TRH por radioinmunoensayo.

5.5. Radioinmunoensayo TRH.

Se utilizaron dos curvas estándar previamente preparadas; la primera con las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 de pg de TRH sintético en 100 µl de buffer RIA (50 mM, pH 7.4, grado RIA 0.25% y 150 mM de cloruro de sodio) y se tomaron 100 µl (por triplicado); la segunda curva se realizó con concentraciones de: 20, 40, 80 y 160 µl de extracto de hipotálamo seco de rata liofilizado (estándar interno), el cuál se resuspendió en 100 µl de buffer.

El precipitado de las muestras se resuspendió en buffer RIA: 500 µl para corteza frontal e hipotálamo y 250 µl para amígdala, núcleo accumbens, hipocampo, eminencia media y corteza insular; se centrifugó a 10 000 rpm durante cinco minutos a 4 °C y del sobrenadante se tomaron por duplicado alícuotas de 100 µl.

Se prepararon tubos T o totales con 100 µl de ^{125}I -TRH con 5000 cpm/tubo; NSB o unión no específica con 200 µl de buffer RIA+100 µl ^{125}I -TRH y tubos B₀ (hormona fría para

evaluar el porcentaje máximo de unión del anticuerpo sin TRH) con 100 µl de buffer RIA + 100 µl de anticuerpo TRH dilución 1: 100 000.

Los tubos de las curvas estándar y las muestras incluyeron 100 µl de ¹²⁵I-TRH y 100 µl de anticuerpo TRH dilución 1: 100 000 (los tubos T y NSB sin anticuerpo); al terminar se agitaron todos los tubos y se dejaron incubando a 4 °C por 36 horas.

Al término de la incubación se adicionó a todos los tubos (excepto totales) 1 ml de etanol absoluto a 4°C (Merck), se centrifugaron a 3 000 rpm durante 30 minutos y se aspiraron los sobrenadantes (excepto de los totales); se determinaron las cuentas por minuto (cpm) en el contador de radiaciones gamma (Wizard 1470).

Por medio de Software "ENRI" se transformaron los valores de cpm a pg (transformación matemática a través de regresión logit-log).

5.6. Radioinmunoensayo de tirotropina (TSH) en suero de rata.

Curva estándar preparada previamente con las siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg de TSH sintético/300 µl buffer RIA (50 mM, pH 7.4, grado RIA 0.25% y 150 mM de cloruro de sodio); la segunda curva se preparó con suero de rata eutiroides con concentraciones de 10, 25, 50 y 100 µl, llevando a un volumen final de 200 µl con buffer RIAc/EDTA (50 mM, pH 7.4, grado RIA 0.25%, 150 mM de cloruro de sodio y 50 Mm EDTA) y 100 µl de anticuerpo TSH (dilución 1:375 000 en buffer RIAc/EDTA).

De las muestras de suero de animales experimentales se tomaron por duplicado 100 µl, adicionado 100 µl de anticuerpo y 100 µl de buffer RIA.

A los tubos controles para NSB o unión no específica se adicionaron 300 µl de buffer RIAc/EDTA y 100µl de ¹²⁵I-TSH; a los tubos B₀ (unión en ausencia de TSH) se agregaron

200 μ l de buffer RIAC/EDTA y 100 μ l de anticuerpo. Se agitaron los tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas.

Los tubos T o totales se prepararon con 100 μ l de 125 I-TSH que contenía 10 000 cpm por tubo, ésta misma cantidad se agregó a todos los tubos y todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas.

Se agregaron a todos los tubos (excepto tubos totales) 100 μ l de suero anti-TSH de conejo en una dilución 1: 40 en buffer fosfatos PBS (50 mM, pH 7.4) y se incubaron por 2 horas; se adicióno a todos los tubos (excepto tubos totales) 1 ml de polietilenglicol al 4% y se centrifugaron a 5 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C (Centrífuga Eppendorf 5810 R) para después aspirar el sobrenadante y determinar cpm en el contador rayos gamma (Wizard 1470).

Por medio de Software "ENRI" se transformaron los valores de cpm a pg (transformación matemática a través de regresión logit-log).

5.7. Radioinmunoensayo corticosterona

De las muestras experimentales se tomaron 3 μ l, se agregaron 1.5 ml de buffer diluyente de esteroides (50 mM, pH 7.4 y 150 mM de cloruro de sodio) y de ésta dilución se tomaron alícuotas de 500 μ l por tubo para medir la concentración de corticosterona.

Curva estándar fue preparada previamente con las siguientes concentraciones: 10, 25, 50, 100, 250, 1000, 2000 y 5000 pg/500 μ l de corticosterona (ICN farmacéutica).

A los tubos totales se agregaron 800 μ l de buffer diluyente; a los tubos NSB o unión no específica 600 μ l y a los tubos B₀ con 500 μ l + 100 μ l de anticuerpo. Se incubaron todos los tubos durante 10 minutos a 98 °C.

Se adicionaron a todos los tubos (excepto T y NSB) 100 μ l de anticuerpo (dilución 1:1 200). A todos los tubos se adicionaron 100 μ l de corticosterona tritiada, $^3\text{H-Cor}$ (equivalente a 10 000 cpm), se agitaron y se incubaron por 24 horas a 4°C.

Al término de la incubación se agregaron a los tubos (excepto a los totales), 200 μ l de solución carbón-dextrán, se agitaron y se incubaron 20 minutos a 4°C, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos.

El sobrenadante se depositó en tubos para conteo de radiaciones β y se adicionaron 40 ml de líquido de centelleo (ICN, Ecolite); se determinaron las cpm durante un minuto en contador rayos β (Beckman).

Por medio de Software "ENRI" se transformaron los valores de cpm a pg (transformación matemática a través de regresión logit-log).

5.8. Ensayo ELISA para cuantificación de leptina.

De las muestras experimentales se tomaron 25 μ l de suero y se completaron a 100 μ l con el buffer de ensayo colocándose en diferentes celdas para posteriormente medir la concentración de leptina.

Curva estándar fue preparada con las siguientes concentraciones: 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 pg/ml de leptina (Calbiochem).

La curva estándar y las muestras se incubaron durante una hora a 37°, posteriormente se realizó un lavado con 200 μ l de buffer para todas las celdas (se repitió 20 ocasiones) y estas se secan. Se adicionó 100 μ l de anticuerpo a cada una de las celdas y se incubaron posteriormente durante 30 min. a 37°C. Se repitió el lavado de las celdas con 200 μ l de buffer (se repitió 10 veces) y se limpiaron las celdas para posteriormente aplicar 100 μ l de la solución de sustrato a cada una de las celdas. Se incubaron las celdas durante 30 min a

temperatura ambiente. Al término de la incubación se leyeron las celdas en espectrofotómetro a 450 nm.

Se obtuvo la absorbancia de las muestras y por medio de la fórmula de regresión lineal se obtuvieron los pg de leptina/ml. Se transformaron los valores de pg a ng.

5.9. Cuantificación de proteínas por el método Lowry.

Las muestras experimentales se hidrolizaron con NaOH 1N (Alyt) durante 12 horas y se tomaron alícuotas (por duplicado) de 10 µl para corteza frontal e hipocampo y alícuotas de 20 µl para núcleo accumbens, amígdala, corteza insular e hipotálamo; todas las muestras se completaron a un volumen final de 200 µl con NaOH 0.5 N (Lowry, 1951).

La curva estándar se preparó con albúmina bovina (Sigma) con concentraciones de 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µl, agregando 100 µl de NaOH 1N y agua destilada para tener un volumen final de 200 µl. A todos los tubos se agregaron 900 µl de solución E (en 100 ml: 98 ml de carbonato de sodio al 2%, 1 ml de tartrato de sodio y potasio al 2% y 1 ml de sulfato cúprico al 1%); se incubaron 10 minutos para posteriormente añadir 100 µl de solución Folín (dilución 1:1), los tubos se incubaron durante 30 minutos. La curva estándar y las muestras se leyeron en el espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer) a 750nm.

5.10. Ensayo colorimétrico para medir actividad enzimática de tiroliberinasa

Se tomaron 100 µl de suero de las muestras experimentales (por duplicado) para realizar la medición a dos tiempos (0 y 60 minutos).

Se preparó una curva estándar con las siguientes concentraciones: 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/µl de βNA, los tubos se llevaron a un volumen final de 250 µl con la solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH 7.4).

A todos los tubos se adicionaron 20 μ l de la enzima dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV), 50 μ l de bacitracina y N-etilmaliemida (BAC-NEM) y 70 μ l de buffer fosfatos (50 mM, pH 7.4); se incubaron cinco minutos a 37°, al iniciar la incubación se agregaron 10 μ l del sustrato TRH- β NA y para terminar la reacción se agregaron 250 μ l de 10 % de ácido tricloroacético (Sigma) y 500 μ l de 0.1% de nitrito de sodio.

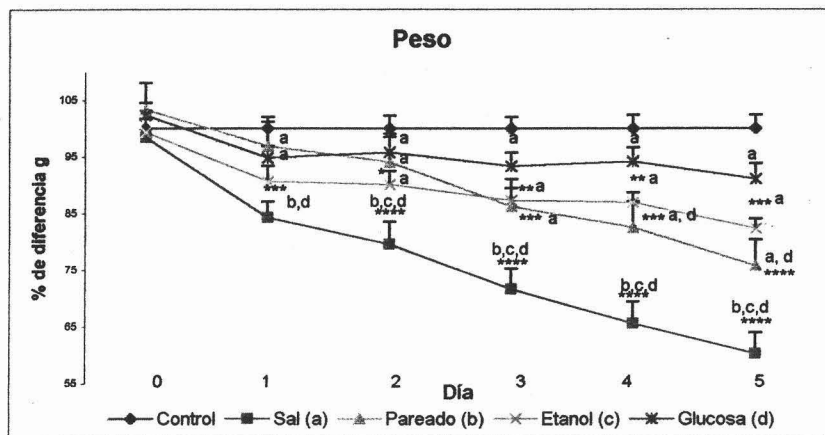
Los tubos se dejaron en hielo durante tres minutos, se agregaron 500 μ l de 0.5% de sulfamato de amonio (Sigma), dejando reposar los tubos por dos minutos para posteriormente adicionar 1ml de N-naftiletildiamida (N-NEDA) al 0.05% y se incubaron por 30 minutos a 37°. Finalmente se cuantificó leyendo en el espectrofotómetro a 580 nm.

5.11. Análisis estadístico de los resultados.

Se realizó prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov para posteriormente realizar prueba de análisis de varianza a una vía (ANOVA) y prueba post-hoc de Scheffe para comparar cambios entre todos los grupos; considerándose una diferencia significativa a partir de $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Peso.



Gráfica 1. Cambios en el peso corporal. Las ratas se pesaron diariamente del día 0 al día 5 [$F_{(29,330)}=11.073$], valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de gramos \pm EEM, $c=100\pm 1.8\%$, $150.13\pm 5.7g$; $n=12$). Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; a: $p<0.05$ vs. sal, b: $p<0.05$ vs. pareado, c: $p<0.05$ vs. etanol, d: $p<0.05$ vs. glucosa.

6.1.1. Grupo sal y grupo pareado.

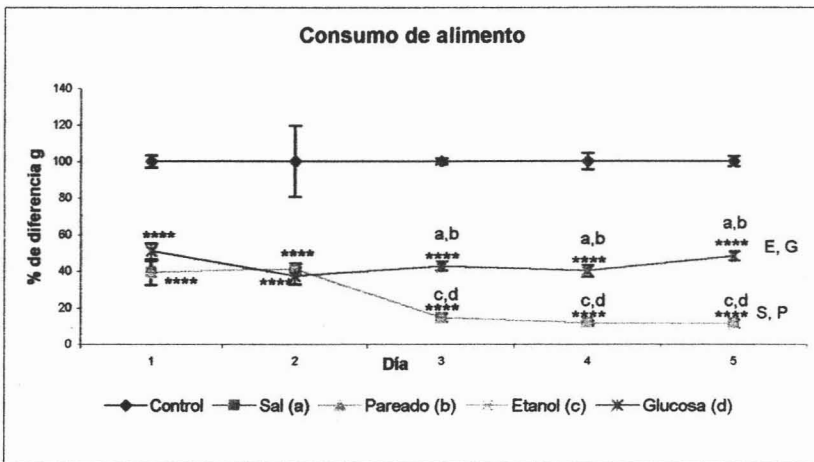
Los animales del grupo sal perdieron peso significativamente con respecto a los animales del grupo control desde el día 1 de tratamiento (control= $100\pm 2.1\%$, sal= $84.2\pm 2.9\%$; control= $153.5\pm 5.6g$, sal= $130\pm 7.39g$; $p<0.001$), esta disminución continuó hasta el día final del experimento (día 5), donde el grupo sal perdió el 40% de peso con respecto al grupo control (control= $100\pm 2.4\%$, sal= $60.1\pm 3.8\%$; control= $168.6\pm 5.2g$, sal= $102.6\pm 8.1g$; $p<0.0001$), en cambio el grupo pareado perdió menos peso que el grupo sal, pero también su reducción fue significativamente diferente del control en 25% (control= $100\pm 2.4\%$, pareado= $75.94\pm 4.7\%$; control= $168.6\pm 5.2g$, pareado= $128\pm 9.5g$; $p<0.0001$) en el día 5. Una diferencia significativa entre los grupos sal y pareado se observó desde el día 1 del experimento (sal= $130\pm 7.39g$. vs pareado= $149.2\pm 9.3g$; $p<0.05$) y hasta el día 5 (sal= $102.6\pm 8.1g$. vs pareado= $128\pm 9.5g$; $p<0.05$).

6.1.2. Grupo etanol y grupo glucosa.

El grupo de etanol mostró diferencia significativa en peso con respecto al control a partir del día 2 (control= 100±12.2%, etanol= 55±2.4%; control= 156.3±5.4g, etanol= 141.1±5.1g; p<0.01). y hasta el final del experimento, disminuyendo en 18% (control= 100±2.4%, etanol= 82.3±1.8%; control= 168.6±5.2g, etanol= 139±4.5g; p<0.0001).

El grupo glucosa no presentó cambios respecto al grupo control o al grupo etanol a lo largo del experimento.

6.2. Consumo de alimento.



Gráfica 2. Consumo de alimento. Se registró diariamente la cantidad de alimento consumido por las ratas (g), del día 1 al día 5 [$F_{(24,275)}=75.769$], valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control (c=100%; promedio de gramos diarios de alimento \pm EEM, c= 100±3.3%, 17.25±0.6g; n=12). Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: ****p<0.0001; a: p <0.05 vs. sal, b: p <0.05 vs. pareado, c: p <0.05 vs. etanol, d: p <0.05 vs. glucosa. S: Sal, P: Pareado, E: Etanol, G: Glucosa.

6.2.1. Grupo sal y pareado.

El grupo sal (oferta de alimentos *ad libitum*) y el grupo pareado (consume misma cantidad de alimento que el grupo sal) presentaron disminución en el consumo de alimentos desde el primer día del experimento (control= $100\pm 3.3\%$, sal y pareado= $39.1\pm 6.5\%$; control= $17.2\pm 0.6\text{g}$, sal y pareado= $6.7\pm 1\text{g}$; $p < 0.0001$) y hasta el día 5 con respecto al grupo control; para el día final del experimento las ratas de estos grupos dejaron de consumir alimento en un 89% (control= $100\pm 2.8\%$, sal y pareado= $11.1\pm 2.3\%$; control= $15.9\pm 0.5\text{g}$, sal y pareado= $1.8\pm 0.3\text{g}$; $p < 0.0001$).

Al normalizar los datos a consumo de alimento en gramos/Kg de peso/día, se observó al final del experimento que el grupo sal y el grupo pareado disminuyeron su ingesta de alimentos en un 78% y 83% respectivamente comparado con el grupo control [$F_{(4,55)}=51.74$; control= $100\pm 4.5\%$, sal= $22.19\pm 6.1\%$; control= $95\pm 4.3\text{ g/Kg}$ peso/día vs sal= $21.2\pm 5.8\text{ g/Kg}$ peso/día, pareado= $15.9\pm 4.1\text{g/Kg}$ peso/día; $p < 0.0001$]; el consumo de kilocalorías (Kcal) en estos grupos fue significativamente menor comparado con el grupo control (control= $100\pm 4.5\%$ vs sal= $22.19\pm 6.14\%$, pareado= $47.86\pm 12.4\%$; control= $285.4\pm 1.3\text{ Kcal/Kg}$ de peso/día vs sal= $63.3\pm 17.5\text{ Kcal/Kg}$ de peso/día, pareado= $47.8\pm 12.4\text{ Kcal/Kg}$ de peso/día; $p < 0.0001$) y los grupos etanol y glucosa (etanol= $171.7\pm 0.3\%$, glucosa= $168\pm 0.2\%$; etanol= $168.2\pm 11.4\text{ Kcal/Kg}$ de peso/día, glucosa= $152.8\pm 10.8\text{ Kcal/Kg}$ de peso/día; $p < 0.05$).

6.2.2. Grupo etanol y grupo glucosa.

El grupo etanol (oferta de alimentos *ad libitum*) y el grupo glucosa (consume misma cantidad de alimento que grupo etanol) presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control desde el día 1 (control= $100\pm 3.3\%$, etanol y glucosa= $50.8\pm 4.2\%$; control= $17.2\pm 0.6\text{g}$, etanol y glucosa= $8.7\pm 0.6\text{g}$; $p < 0.0001$) y hasta el día 5, resultando al final del experimento una disminución en su consumo de alimento sólido del 52% (control= $100\pm 2.8\%$, etanol y glucosa= $48.2\pm 2.5\%$; control= $15.9\pm 0.5\text{g}$, etanol y glucosa= $7.6\pm 0.4\text{g}$;

$p < 0.01$). La reducción no fué tan marcada como en el grupo sal y pareado; desde el día 3 (sal y pareado= $14.2 \pm 2.2\%$, etanol y glucosa= $42.6 \pm 2.3\%$; sal y pareado= $2.4 \pm 0.3\text{g}$, etanol y glucosa= $7.6 \pm 0.4\text{g}$; $p < 0.05$) y hasta el final del experimento se observó diferencia significativa entre los grupo sal y pareado contra etanol y glucosa (sal y pareado= $11.1 \pm 2.3\%$, etanol y glucosa= $48.2 \pm 2.5\%$; sal y pareado= $1.8 \pm 0.3\text{g}$, etanol y glucosa= $7.6 \pm 0.4\text{g}$; $p < 0.05$).

Al final del experimento, se observó que la cantidad de alimento sólido expresado en g/Kg peso/día disminuyó en un 42% (etanol) y 48% (glucosa) comparado con el grupo control (control= $100 \pm 4.5\%$ vs etanol= $58.94 \pm 4\%$, glucosa= $53.5 \pm 3.7\%$; control= 95 ± 4.3 g/Kg peso/día vs etanol= 56 ± 3.8 g/Kg peso/día, glucosa= $50.9 \pm 3.6\text{g/Kg}$ peso/día; $p < 0.0001$); el consumo de kilocalorías (Kcal) en estos grupos fue significativamente menor comparado con el grupo control (control= 285.4 ± 1.3 Kcal/Kg de peso/día vs etanol= 168.27 ± 11.4 Kcal/Kg de peso/día y glucosa= 152.85 ± 10.8 Kcal/Kg de peso/día; $p < 0.0001$) y los grupos sal y pareado (etanol y glucosa vs sal= 63.3 ± 17.5 Kcal/Kg de peso/día y pareado= 47.8 ± 12.4 Kcal/Kg de peso/día; $p < 0.05$).

6.3. Consumo de líquido.

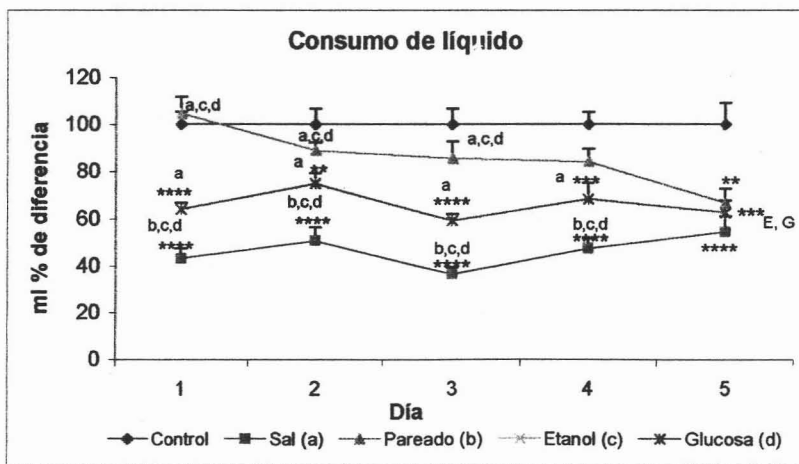
6.3.1. Grupo sal y pareado.

El grupo sal consumió menor cantidad de líquidos desde el primer día del experimento (control= $100 \pm 3.6\%$, sal = $42.8 \pm 4.3\%$; control= $65.6 \pm 3.5\text{ml}$, sal= $28.1 \pm 2\text{ml}$; $p < 0.0001$) y hasta el día final con respecto al grupo control, la reducción fue de 47% (control= $100 \pm 9.2\%$, sal= $53.9 \pm 6.9\%$; control= $71.6 \pm 6.6\text{ml}$, sal= $38.5 \pm 4.7\text{ml}$; $p < 0.0001$). El grupo pareado difirió significativamente del grupo control disminuyendo su consumo de agua en un 34% sólo al final de experimento (control= $100 \pm 9.2\%$, pareado= $66.6 \pm 6\%$; control= $71.6 \pm 6.6\text{ml}$, pareado= $48.1 \pm 4.2\text{ml}$; $p < 0.01$). Se observó diferencia significativa entre el grupo sal y el grupo pareado del día 1 y hasta el día 4 del experimento (sal= $47 \pm 4.3\%$,

pareado= 83.9±5.5%; sal= 33.7±3.4ml, pareado= 59.7±4.3 ml; p<0.05), aunque el día 5 consumieron igual cantidad de líquido.

6.3.2. Grupo etanol y grupo glucosa.

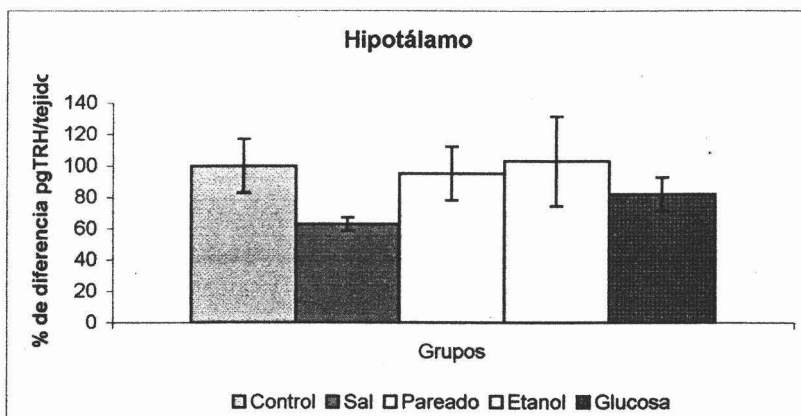
El grupo etanol y el grupo glucosa presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control desde el día 1 (control= 100±3.6%, etanol y glucosa= 63.6±2.8%; control= 65.6±3.5ml, etanol y glucosa= 42.1±1.7ml; p<0.0001) y hasta el día 5, donde disminuyó su consumo de solución en un 38% (control= 100±9.2%, etanol y glucosa= 62.4±5.2%; control= 71.6±6.6ml, etanol y glucosa= 44.8±3.0ml; p<0.001). La solución de etanol proporcionó 45.4±3.5g de etanol/Kg peso/día (equivalente a 322.6±25.3 Kcal/Kg peso/día) mientras que la solución de glucosa aportó 81.7±3.6 g/Kg peso/día (equivalente a 327.1±22.6 Kcal/Kg peso/día); siendo así similar la cantidad de Kcal/Kg de peso/día recibidas entre estos grupos.



Gráfica 3. Consumo de solución. Se registró diariamente la cantidad de solución consumida por las ratas (ml), del día 1 al día 5 [$F_{(24,256)}=14.062$], valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control (c=100%; promedio de ml diarios de líquido ± EEM, c= 100±3.6%, 65.67±3.5ml; n=12). Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; a: p <0.05 vs. sal, b: p <0.05 vs. pareado, c: p <0.05 vs. etanol, d: p <0.05 vs. glucosa. E: Etanol, G: Glucosa.

El aporte de Kcal totales (KcalT) del grupo etanol y el grupo glucosa aumentó significativamente de las KcalT que recibió el grupo control [$F_{(4,55)}=117.3$; control= $100 \pm 4.5\%$ vs etanol= $171.71 \pm 0.3\%$, glucosa= $168.07 \pm 0.3\%$; control= 285.4 ± 13 KcalT/Kg peso/día vs etanol= 490.8 ± 27.7 KcalT/Kg peso/día, glucosa= 479.9 ± 23.8 KcalT/Kg peso/día; $p < 0.0001$]; así como también de las que recibieron los grupos sal y pareado (sal= 63.3 ± 17.5 KcalT/Kg peso/día, pareado= 47.86 ± 12.4 KcalT/Kg peso/día; $p < 0.05$).

6.4. Contenido de TRH en hipotálamo.



Gráfica 4. Contenido de TRH en hipotálamo. TRH cuantificado por ensayo RIA, valores expresados como porcentaje de diferencia de pgTRH/tejido con respecto al grupo control [$F_{(4,55)}=0.884$; $c=100\%$, promedio de pgTRH/tejido \pm EEM, $c=100 \pm 17.13\%$, 634.94 ± 108.7 pgTRH/tejido, $n=12$]. Análisis ANOVA.

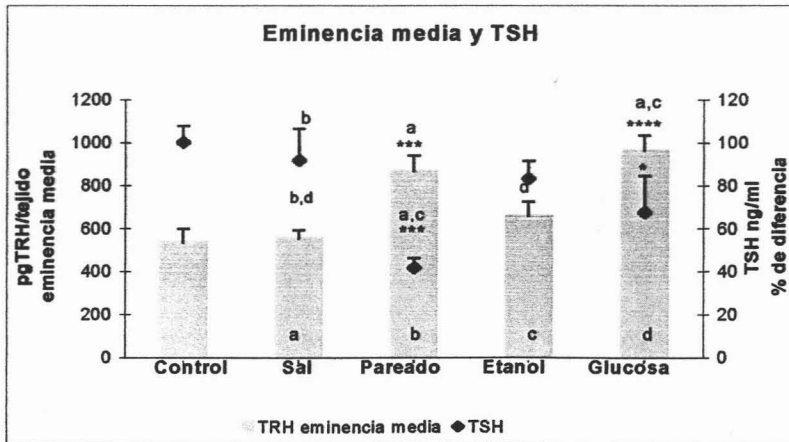
El contenido de TRH no se modificó en el hipotálamo ni por el efecto de la deshidratación ni por la restricción alimentaria forzada o el consumo de una solución de etanol o por el consumo de una solución de glucosa.

6.5. Contenido de TRH en la eminencia media y en la concentración sérica de TSH.

6.5.1. Grupos sal y pareado.

En el grupo sal no se encontró cambio significativo en el contenido de TRH en la eminencia media con respecto al grupo control, pero si mostró diferencia significativa contra el grupo pareado (sal= 552.8 ± 37.3 pgTRH/tejido, pareado= 867.1 ± 72.5 pgTRH/tejido; $p < 0.05$); también se observó diferencia entre el grupo sal y el grupo glucosa (glucosa= 965.5 ± 66.4 pgTRH/tejido; $p < 0.05$).

La concentración sérica de TSH en el grupo sal no cambió contra el grupo control, sin embargo fue significativamente diferente en la concentración de TSH contra el grupo pareado en un 50% (sal= 2.1 ± 0.3 ng/ml, pareado= 1.0 ± 0.2 ng/ml; $p < 0.05$).



Gráfica 5. Concentración sérica de TSH y contenido de TRH en la eminencia media. Concentración sérica de TSH (ng/ml) y TRH (pgTRH/tejido) cuantificados por RIA. Valores de TSH expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,48)}=5.082$; $c=100\%$; promedio de ng/ml \pm EEM, $c=100 \pm 8.1\%$, 2.60 ± 0.2 ng/ml; $n=12$]; valores de TRH en eminencia media expresados como pgTRH/tejido [$F_{(4,53)}=9.96$; promedio de pgTRH/tejido \pm EEM, $c=534.17 \pm 61.95$ pgTRH/tejido; $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; a: $p < 0.05$ vs. sal, b: $p < 0.05$ vs. pareado, c: $p < 0.05$ vs. etanol, d: $p < 0.05$ vs. glucosa.

El contenido de TRH en la eminencia media del grupo pareado además de diferir significativamente contra el grupo sal también presentó cambio significativo contra el grupo control (control= $100 \pm 11.5\%$, pareado= $162.33 \pm 13.5\%$; control= 534.1 ± 61.8 pgTRH/tejido, pareado= 867.1 ± 72.5 pgTRH/tejido; $p < 0.001$). Se observaron cambios significativos en la concentración sérica de TSH del grupo pareado contra el grupo control (control= $100 \pm 8.1\%$, pareado= $41.53 \pm 5.1\%$; control= 2.6 ± 0.2 ng/ml, pareado= 1.0 ± 0.1 ng/ml; $p < 0.001$) y el grupo etanol (etanol= 2.1 ± 0.2 ng/ml; $p < 0.05$).

6.5.2. Grupos etanol y glucosa.

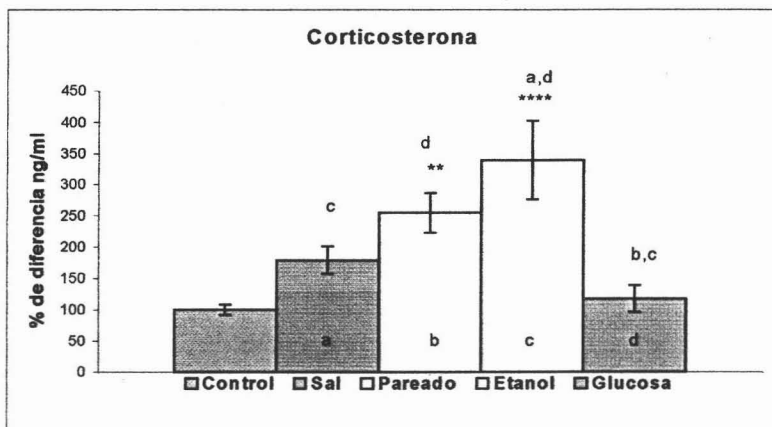
El grupo etanol no presentó diferencias significativas con respecto al grupo en el contenido de TRH, pero sí se observó diferencia significativa contra el grupo glucosa (etanol= 657.4 ± 65.7 pgTRH/tejido, glucosa= 965.5 ± 66.4 pgTRH/tejido; $p < 0.05$). En el grupo etanol no se observó diferencia significativa en la concentración sérica de TSH contra el grupo control. En el grupo glucosa se observó aumento significativo en el contenido de TRH comparado contra el grupo control (control= $100 \pm 11.5\%$, glucosa= $180.75 \pm 12.4\%$; control= 534.1 ± 61.8 pgTRH/tejido, glucosa= 965.5 ± 66.4 pgTRH/tejido; $p < 0.0001$). La concentración sérica de TSH disminuyó significativamente en el grupo glucosa, comparada contra la del grupo control, en un 36% (control= $100 \pm 8.1\%$, glucosa= $63.2 \pm 14.6\%$; control= 2.6 ± 0.2 ng/ml, glucosa= 1.6 ± 0.3 ng/ml; $p < 0.05$).

6.6. Concentración sérica de corticosterona.

6.6.1. Grupos sal y pareado.

Aunque el grupo sal no presentó incremento estadísticamente significativo en la concentración sérica de corticosterona con respecto al grupo control por medio de ANOVA, la tendencia en la concentración sérica de corticosterona es de aumento ya que en la prueba t-Student si se observó diferencia significativa (control= $100 \pm 8.1\%$, sal= $180.94 \pm 26.5\%$; control= 0.22 ± 0.2 ng/ml, sal= 0.41 ± 0.08 ng/ml; $p < 0.05$). Además el grupo

sal difirió significativamente del grupo etanol (etanol= 0.75 ± 0.1 ng/ml; $p < 0.05$). El grupo pareado presentó aumento significativo en la concentración sérica de corticosterona, al comparar contra el grupo control en un 154% (control= $100 \pm 8.1\%$, pareado= $254.5 \pm 32.1\%$; control= 0.22 ± 0.2 ng/ml, pareado= 0.57 ± 0.07 ng/ml; $p < 0.01$); este aumento fue significativo también al comparar contra el grupo glucosa (glucosa= 0.26 ± 0.05 ng/ml; $p < 0.05$).



Gráfica 6. Concentración de corticosterona en suero. Corticosterona en suero cuantificada por RIA, valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,39)}=6.24$; $c=100\%$; promedio de ng/ml \pm EEM, $c=100 \pm 8.13$, 0.22 ± 0.2 ng/ml, $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; a: $p < 0.05$ vs. sal, b: $p < 0.05$ vs. pareado, c: $p < 0.05$ vs. etanol, d: $p < 0.05$ vs. glucosa.

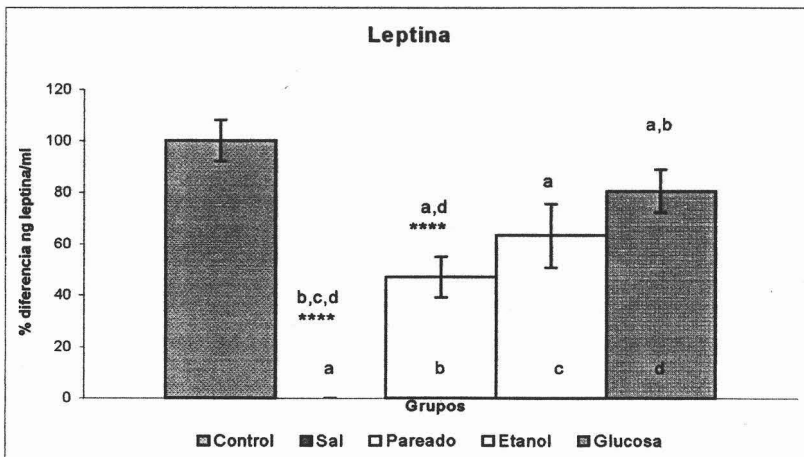
6.6.2. Grupos etanol y glucosa.

El grupo etanol presentó un aumento significativo del 238%, en la concentración de corticosterona, con respecto al grupo control (control= $100 \pm 8.1\%$, etanol= $338.76 \pm 62.8\%$; control= 0.22 ± 0.2 ng/ml, etanol= 0.75 ± 0.1 ng/ml; $p < 0.05$), además de diferir significativamente del grupo glucosa (glucosa= 0.26 ± 0.05 ng/ml; $p < 0.05$). El grupo glucosa no presentó diferencia significativa respecto al grupo control.

6.7. Concentración sérica de leptina.

6.7.1. Grupos sal y pareado.

El grupo sal presentó niveles de leptina significativamente bajos (menor al límite de detección) con respecto al grupo control (control= $100 \pm 8.6\%$, sal= no detectable; control= 6.96 ± 0.8 ng/ml, sal= no detectable; $p < 0.0001$) y también con respecto a los otros grupos experimentales (pareado= $42.2 \pm 8.5\%$, etanol= $63.1 \pm 12.2\%$, glucosa= $80.4 \pm 8.3\%$; pareado 3.07 ± 0.3 ng/ml, etanol= 4.41 ± 0.8 ng/ml, glucosa= 5.14 ± 0.5 ng/ml; $p < 0.05$). El grupo pareado presentó una reducción del 58% en la concentración de leptina comparado con el grupo control (control= 6.96 ± 0.8 ng/ml, pareado= 3.07 ± 0.3 ng/ml; $p < 0.0001$), esta reducción en la concentración de leptina, fue significativa al comparar contra el grupo glucosa (glucosa= 5.14 ± 0.5 ng/ml; $p < 0.05$).

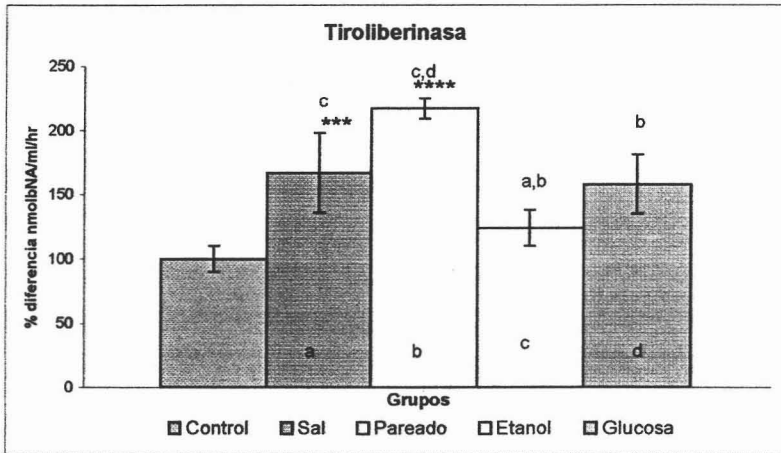


Gráfica 7. Concentración de leptina en suero. Leptina en suero cuantificada por ensayo ELISA. valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,42)}=20.19$; $c=100\%$; promedio de ng/ml \pm EEM, $c=100 \pm 8.62$, 6.96 ± 0.8 ng/ml, $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; a: $p < 0.05$ vs. sal, b: $p < 0.05$ vs. pareado, c: $p < 0.05$ vs. etanol, d: $p < 0.05$ vs. glucosa.

6.7.2. Grupos etanol y glucosa.

El grupo etanol no presentó cambios significativos en la concentración de leptina en suero contra el grupo control; de igual manera el grupo glucosa no difirió significativamente del grupo control.

6.8. Actividad de tiroliberinasa en suero.



Gráfica 8. Actividad de tiroliberinasa en suero. Tiroliberinasa en suero cuantificada por ensayo colorimétrico, valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,55)}=11.787$; $c=100\%$; promedio de $\text{nmol}\beta\text{NA/ml/hr} \pm \text{EEM}$, $c=100 \pm 6.6$, 4.08 ± 0.41 $\text{nmol}\beta\text{NA/ml/hr}$, $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; a: $p<0.05$ vs. sal, b: $p<0.05$ vs. pareado, c: $p<0.05$ vs. etanol, d: $p<0.05$ vs. glucosa.

6.8.1. Grupos sal y pareado.

El grupo sal difirió significativamente del grupo control en la actividad de tiroliberinasa en suero, ya que las ratas del grupo sal presentaron mayor actividad de la enzima en un 67% que el grupo control (control= $100 \pm 6.6\%$, sal= $167.58 \pm 20.9\%$; control= 4.08 ± 0.4 $\text{nmol}\beta\text{NA/ml/hr}$, sal= 6.8 ± 1.2 $\text{nmol}\beta\text{NA/ml/hr}$; $p<0.001$). En el grupo pareado hay mayor actividad de la enzima con respecto al grupo control en un 117% (control= $100 \pm 6.6\%$,

pareado= $217.17 \pm 5.3\%$; control= 4.08 ± 0.4 nmol β NA/ml/hr, pareado= 8.8 ± 0.3 nmol β NA/ml/hr; $p < 0.0001$); debido a que el grupo pareado es el grupo que presenta mayor actividad de tiroliberinasa en suero, este grupo difirió significativamente también de los grupos etanol y glucosa (etanol = 5.0 ± 0.5 nmol β NA/ml/hr, glucosa= 6.4 ± 0.9 nmol β NA/ml/hr; $p < 0.05$).

6.8.2. Grupos etanol y glucosa.

Los grupos etanol y glucosa no presentaron diferencia significativa con el grupo control en la actividad de tiroliberinasa. El grupo etanol difirió significativamente del grupo sal en la actividad de tiroliberinasa (etanol= $124 \pm 9.4\%$, sal= $167.58 \pm 20.9\%$; etanol = 5.0 ± 0.5 nmol β NA/ml/hr, sal= 6.8 ± 1.2 nmol β NA/ml/hr; $p < 0.05$), así como también del grupo pareado (pareado= $217.1 \pm 5.3\%$; pareado= 8.8 ± 0.3 nmol β NA/ml/hr; $p < 0.05$).

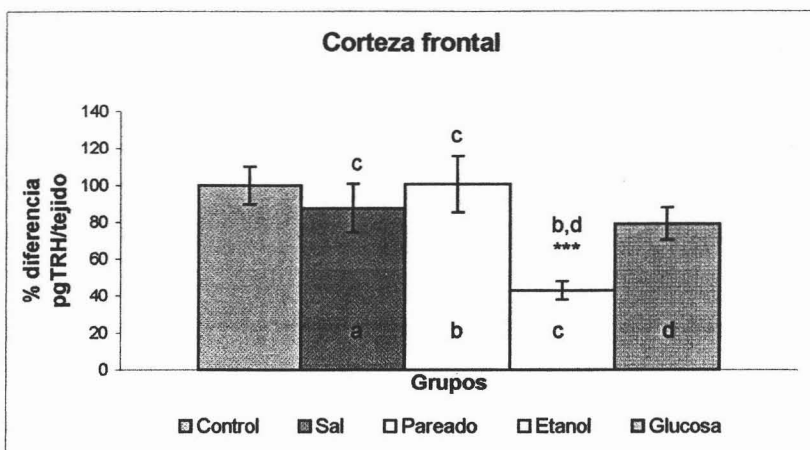
6.9. Contenido de TRH en el sistema límbico.

A continuación se presentan los cambios en el contenido de TRH en diferentes regiones del sistema límbico implicadas en diferentes aspectos en la regulación de la conducta alimentaria.

6.9.1. Corteza frontal.

6.9.1.1. Grupos sal y pareado.

En el contenido de TRH en la corteza frontal el grupo sal no presentó diferencia con respecto al grupo control o al grupo pareado. El grupo pareado difirió significativamente al comparar contra el grupo etanol (pareado= 289.17 ± 43.5 pgTRH/tejido, etanol= 123.83 ± 14.1 pgTRH/tejido; $p < 0.05$), sin presentar cambios contra los otros grupos.



Gráfica 9. Concentración de TRH en corteza frontal. TRH cuantificada por ensayo RIA, valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,55)}=4.61$; $c=100\%$; promedio de $\text{pgTRH/tejido} \pm \text{EEM}$, $c=100 \pm 10.22\%$, $287.81 \pm 29.41 \text{ pgTRH/tejido}$, $n=12$]. Análisis ANOVA. diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; a: $p < 0.05$ vs. sal, b: $p < 0.05$ vs. pareado, c: $p < 0.05$ vs. etanol, d: $p < 0.05$ vs. glucosa.

6.9.1.2 Grupos etanol y glucosa.

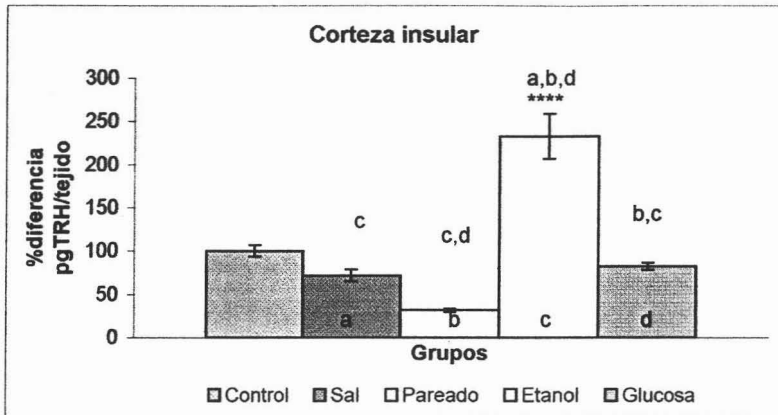
El grupo etanol disminuyó significativamente contra el grupo control en el contenido de TRH en la corteza frontal (control= $100 \pm 10.2\%$, etanol= $55.7 \pm 9.9\%$; control= $287.8 \pm 29.3 \text{ pgTRH/tejido}$, etanol= $123.3 \pm 14.1 \text{ pgTRH/tejido}$; $p < 0.001$). El grupo glucosa no presentó cambios significativos contra el grupo control o al grupo etanol.

6.9.2. Corteza insular.

6.9.2.1. Grupos sal y pareado.

En el contenido de TRH en la corteza insular el grupo sal no presentó diferencia con respecto al grupo control o el grupo pareado, la diferencia significativa se observó contra el

grupo etanol (sal= 1190±10.9 pgTRH/tejido, etanol= 384.8±43.1 pgTRH/tejido; p<0.05). El grupo pareado no presentó diferencia significativa en el contenido de TRH contra el grupo control, pero se modificó significativamente del grupo etanol (etanol= 384.8±143.1 pgTRH/tejido; p<0.05) y del grupo glucosa (glucosa= 136±6.9 pgTRH/tejido; p<0.05).



Gráfica 10. Concentración de TRH en corteza insular. TRH cuantificada por ensayo RIA, valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,57)}=31.55$; $c=100\%$; promedio de pgTRH/tejido \pm EEM, $c=100 \pm 6.59\%$, 165.22 ± 10.89 pgTRH/tejido, $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; a: $p<0.05$ vs. sal, b: $p<0.05$ vs. pareado, c: $p<0.05$ vs. etanol, d: $p<0.05$ vs. glucosa.

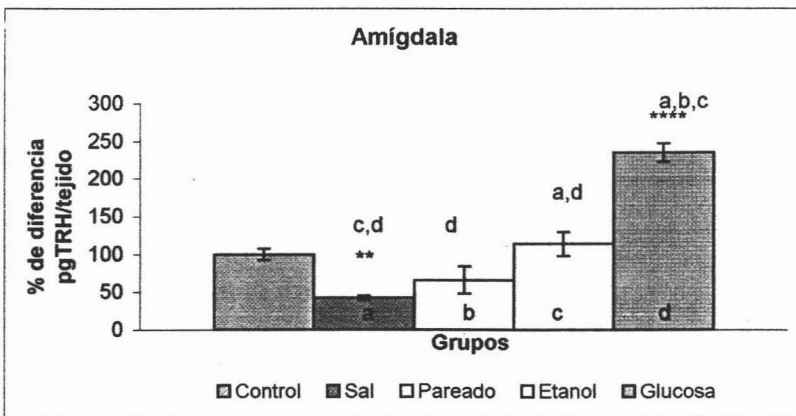
6.9.2.2. Grupos etanol y glucosa.

El grupo etanol aumentó significativamente la cantidad de TRH con respecto al grupo control (control= $100 \pm 6.5\%$, etanol= $232.9 \pm 26.1\%$; control= 165.2 ± 10.8 pgTRH/tejido, etanol= 384.8 ± 43.1 pgTRH/tejido; $p<0.0001$). El grupo glucosa no presentó cambios significativos contra el grupo control, pero si contra los grupos pareado (glucosa= 136 ± 6.9 pgTRH/tejido, pareado= 52.62 ± 3.4 pgTRH/tejido; $p<0.05$) y el grupo etanol. (etanol= 384.85 ± 43.1 pgTRH/tejido; $p<0.05$).

6.9.3. Amígdala.

6.9.3.1. Grupos sal y pareado.

El grupo sal redujo significativamente el contenido de TRH en la amígdala con respecto al grupo control (control= $100 \pm 7.5\%$, sal= $42.71 \pm 2.7\%$; control= 273.5 ± 20.6 pgTRH/tejido, sal= 116.8 ± 7.4 pgTRH/tejido; $p < 0.001$), además de diferir significativamente de los grupos etanol (etanol= 311.16 ± 43.4 pgTRH/tejido; $p < 0.05$) y glucosa (glucosa= 642.86 ± 33.74 pgTRH/tejido; $p < 0.05$). El grupo pareado no presentó cambios significativos contra el grupo control o el grupo sal, pero si se observó diferencia significativa al comparar con el grupo glucosa (glucosa= 642.86 ± 33.7 pgTRH/tejido; $p < 0.05$).



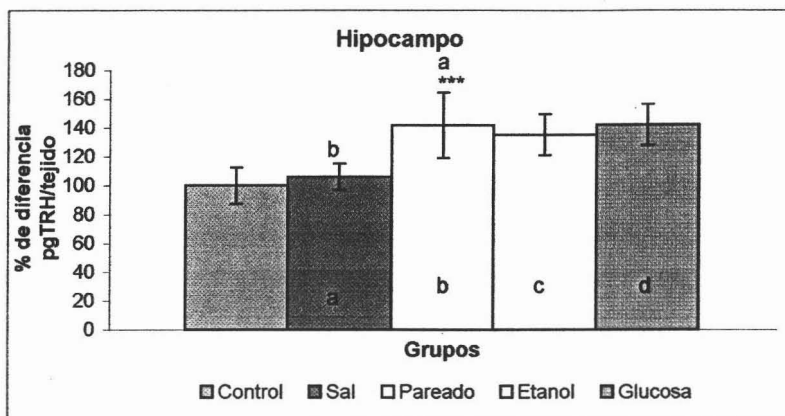
Gráfica 11. Concentración de TRH en amígdala. TRH cuantificada por ensayo RIA, valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,53)}=31.99$; $c=100\%$; promedio de pgTRH/tejido \pm EEM, $c=100 \pm 7.5$, 273.55 ± 20.64 pgTRH/tejido, $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; a: $p < 0.05$ vs. sal, b: $p < 0.05$ vs. pareado, c: $p < 0.05$ vs. etanol, d: $p < 0.05$ vs. glucosa.

6.9.3.2. Grupos etanol y glucosa.

El grupo etanol no presentó diferencia significativa al comparar contra el grupo control aunque si se observaron cambios contra el grupo glucosa (etanol= 311.16 ± 43.4

pgTRH/tejido, glucosa= 642.8 ± 33.7 pgTRH/tejido; $p < 0.05$). El grupo glucosa aumento significativamente el contenido de TRH al comparar contra el grupo control (control= $100 \pm 7.5\%$, glucosa= $235 \pm 12.3\%$; control= 273.5 ± 20.6 pgTRH/tejido, glucosa= 642.86 ± 33.7 pgTRH/tejido; $p < 0.0001$).

6.9.4. Hipocampo.



Gráfica 12. Concentración de TRH en hipocampo. TRH cuantificada por ensayo RIA, valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,53)}=5.039$; $c=100\%$; promedio de pgTRH/tejido \pm EEM, $c=100 \pm 12.7$, 1335.24 ± 170.34 pgTRH/tejido, $n=12$]. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; a: $p < 0.05$ vs. sal, b: $p < 0.05$ vs. pareado, c: $p < 0.05$ vs. etanol, d: $p < 0.05$ vs. glucosa.

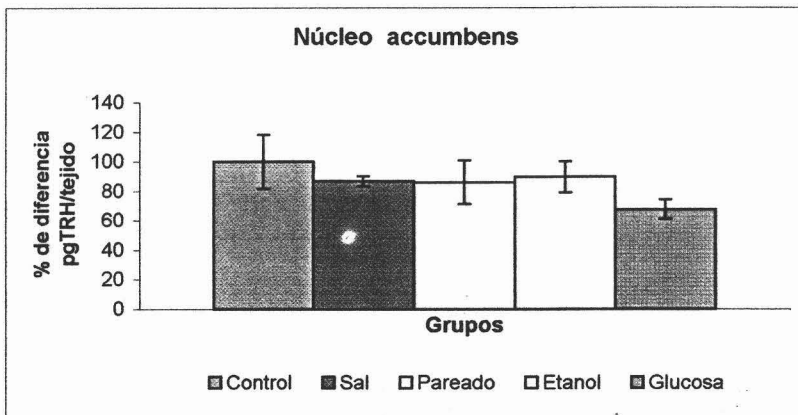
6.9.4.1. Grupos sal y pareado.

El grupo sal no presentó cambios en el contenido de TRH en el hipocampo con respecto al grupo control, se observaron cambios significativos contra el grupo pareado (sal= 1414.39 ± 121.1 pgTRH/tejido, pareado= 2272.67 ± 127.62 pgTRH/tejido; $p < 0.05$). El grupo pareado aumentó significativamente en el contenido de TRH del hipocampo, contra el grupo control (control= $100 \pm 12.7\%$, pareado= $170.21 \pm 9.5\%$; control= 1335.24 ± 170.18 pgTRH/tejido, pareado= 2272.6 ± 127.6 pgTRH/tejido; $p < 0.001$).

6.9.4.2. Grupos etanol y glucosa.

El grupo etanol no presentó cambio significativo contra el grupo control o contra el grupo glucosa. El grupo glucosa no presentó cambios significativo contra el grupo control.

6.9.5. Núcleo accumbens.



Gráfica 13. Concentración de TRH en núcleo accumbens. TRH cuantificada por ensayo RIA. valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control [$F_{(4,53)}=0.941$; $c=100\%$; promedio de pgTRH/tejido \pm EEM, $c=100 \pm 17.13\%$, 185.41 ± 33.70 pgTRH/tejido, $n=12$]. Análisis ANOVA. diferencia significativa con respecto al grupo control: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$; a: $p <0.05$ vs. sal, b: $p <0.05$ vs. pareado, c: $p <0.05$ vs. etanol, d: $p <0.05$ vs. glucosa.

El contenido de TRH no se modificó en el núcleo accumbens ni por el efecto de la deshidratación ni por la restricción alimentaria forzada o el consumo de una solución de etanol o por el consumo de una solución de glucosa.

En la tabla 1 se muestran los cambios observados de las ratas púberes, en el contenido de TRH (aumento o disminución) en cada una de las regiones límbicas implicadas en la conducta alimentaria bajo los diferentes tratamientos experimentales de estudio (modelos de anorexia y restricción alimentaria), comparado con el grupo control.

SISTEMA LÍMBICO (región)	GRUPOS EXPERIMENTALES			
	<i>Sal</i>	<i>Pareado</i>	<i>Etanol</i>	<i>Glucosa</i>
<i>Corteza frontal</i>	—	—	↓	—
<i>Corteza insular</i>	—	—	↑	—
<i>Amígdala</i>	↓	—	—	↑
<i>Hipocampo</i>	—	↑	—	—
<i>Núcleo accumbens</i>	—	—	—	—

Tabla 1. Cambios en el contenido de TRH en las diferentes regiones límbicas. Análisis ANOVA, diferencia significativa con respecto al grupo control.

- Contenido de TRH similar a lo observado en el grupo control
- ↑ Aumento significativo en el contenido de TRH contra el grupo control
- ↓ Disminución significativa en el contenido de TRH contra el grupo control.

7. Discusión.

La conducta de ingesta de alimentos es regulada por mecanismos que involucran diferentes tipos de señales ya sea neuronales, peptidérgicas, viscerales u hormonales; cambios en algunas de estas señales provocan diferentes respuestas de adaptación metabólica en los organismos que podrían desencadenar algún trastorno como la obesidad, anorexia, bulimia, desnutrición, etc.

7.1. Cambios en el peso corporal.

7.1.1. Grupo sal y grupo pareado.

En el grupo sal se pudo reproducir la aversión por el consumo de alimento, tal como se observa en el estudio de Watts *et al.* (1999), ya que el consumo de la solución salina al 2.5% provocó en los animales la disminución de la ingestión de alimentos de manera voluntaria, a pesar de haberseles ofrecido alimento *ad libitum*.

El grupo pareado, forzado a ingerir la misma cantidad de alimento que el grupo sal, presentó menor pérdida de peso al final del experimento a pesar de estar sometido a restricción alimentaria; debido a que el alimento para roedores o "pellet" (Lab Rodent Diet 5001) fue su fuente única de nutrimentos éstos grupos redujeron la cantidad de kilocalorías totales (KcalT) consumidas por día así como la cantidad de g/kg de peso diario, siendo mayor la reducción del consumo de KcalT en el grupo pareado. La pérdida de peso en el grupo sal no solo podría estar relacionada con el bajo consumo de KcalT ya que el grupo pareado consumió la misma cantidad de kilocalorías e incluso menor cuando se expresa por kg de peso y no redujo tanto su peso. La edad de nuestros animales es un factor que podría estar involucrado en la diferencia en la pérdida de peso ya que al someter al mismo tratamiento de deshidratación a animales adultos, durante 5 días, éstos no presentan reducción de peso significativa contra el control (Watts *et al* 1999); además el ayuno de 48h provoca diferente pérdida de peso entre ratas adultas y recién destetadas ya que mientras las adultas pierden el 10%, las recién destetadas pierden el 30% (de Gortari *et al*

2000a); esta pérdida de peso está relacionada con diferencias en la adaptación metabólica del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT), por lo que es posible pensar que un funcionamiento diferencial del eje tiroideo entre el grupo y pareado haya contribuido a acelerar la disminución de peso en los animales sometidos a anorexia por deshidratación.

La pérdida de peso en el grupo sal puede estar relacionada directamente con el proceso de deshidratación al que fueron sometidas estas ratas (debido al consumo de solución salina); la deshidratación durante 48 h en ratones macho adultos provoca aumento en la densidad de receptores de angiotensina (Ang) en el NPV y en la pituitaria anterior (Morris *et al.*, 1999). El papel de la angiotensina es aumentar la sensación de sed así como inhibir el apetito por sal lo que pudo llevar a las ratas del grupo sal a consumir menor cantidad de líquido con respecto al grupo pareado. Considerada como una condición estresante, la deshidratación durante 48h en ratas y ratones macho adultos provoca aumento de la hormona vasopresina (VP) en plasma (Ciosek, 2002; Morris *et al.*, 1999), provocando la liberación de corticosterona (Wotus *et al.*, 2003), en el grupo sal se observó cambio en la concentración de corticosterona sérica con respecto al grupo control que aunque no fue significativo, sí demuestra una tendencia al aumento; aunque el efecto del estrés no pareció un factor determinante en la pérdida de peso en el grupo sal ya que si bien la concentración de corticosterona tendió al aumento en las ratas deshidratadas y pudiera contribuir al gasto de reservas energéticas y disminución de peso por activar el catabolismo (Schwartz *et al.*, 1999), este aumento también apareció en el grupo pareado quien no redujo su peso tan dramáticamente; además la deshidratación puede modificar vías de otros neuropéptidos y neurotransmisores que se han implicado en la regulación central de la conducta alimentaria, ya que la deshidratación provoca aumento de RNAm de CRH (anorexigénico) en el hipotálamo lateral el cual es uno de los centros de regulación de la ingesta de alimentos en el hipotálamo (Watts *et al.* 1999).

7.1.2. Grupo etanol y grupo glucosa.

El consumo de una solución de etanol al 20% modificó el patrón de conducta alimentaria en las ratas púberes, ya que éstas dejan de consumir alimento (oferta de alimento *ad*

libitum) de manera voluntaria comparado con el grupo control; de manera similar, esta inhibición voluntaria de la ingestión de alimentos lo reportan Nikodemova *et al.* (1998) en ratas macho adultas con la ingestión de una solución de etanol al 10% después de 4 semanas. Además de modificar el patrón de ingesta de alimentos, el consumo de etanol modificó la ingesta de líquidos ya que el grupo etanol redujo su consumo con respecto al control; el bajo consumo de la solución de etanol observado en nuestras ratas lo han reportado Piano *et al.* (2001) en ratas macho adultas sometidas a una solución de etanol al 9% durante 16 días.

El consumo de una solución de etanol al 20% produjo una reducción del peso corporal de las ratas púberes, así como en la ingestión de alimento sólido en comparación con el grupo control; el consumo de esta misma solución provoca en ratas adultas macho reducción de peso a partir de la 3ª y hasta la 8ª semana de ingestión de etanol, a diferencia de lo observado en ratas hembras adultas las cuáles no presentan pérdida de peso (de Gortari *et al.* 2004); esto nos sugiere que los cambios provocados por la ingestión de una misma solución de etanol provoca diferente pérdida de peso dependiendo de la edad y el género de los animales, ya que nuestras ratas púberes perdieron el 18% del peso en comparación con el grupo control después de 5 días de experimentación. Puesto que el grupo glucosa ingirió la misma cantidad de alimento sólido que el grupo etanol y una solución isocalórica con respecto a este grupo, la cantidad de kcal totales ingerida por estos grupos fue la misma; normalizando los datos a consumo de kcal totales por kg de peso el total de energía consumida fue del 72% mayor en el grupo etanol y 68% mayor en el grupo glucosa comparado con el control. A pesar de que el aporte de kcal fue el mismo, la diferente pérdida de peso del grupo etanol contra el grupo glucosa pudo deberse al incremento de corticosterona sérica observado en el grupo etanol, el cual activa las vías catabólicas causando reducción de sus reservas energéticas e incrementando la lipólisis y termogénesis (Kalra *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1999); otro de los factores que pudo provocar pérdida de peso del grupo etanol, pudo ser el efecto de una posible deshidratación ya que el alcohol inhibe la secreción de vasopresina (VP) de la pituitaria provocando un efecto como diurético (Collins *et al.*, 1992; Eisenhofer y Johnson, 1982; Kleeman *et al.*, 1955), ésto pudo llevar a la pérdida constante de líquidos y provocar deshidratación en ratas del grupo

etanol, contribuyendo así a la pérdida de peso corporal. No podemos descartar el efecto del etanol sobre otros neuropéptidos involucrados en la regulación de la conducta alimentaria; es posible que la anorexia observada en el grupo etanol se deba a alteraciones en vías de acción como las de NPY (orexigénico) ya que se observa que ratas con preferencia en el consumo de etanol presentan bajos niveles de NPY comparado con ratas que no lo consumen (Egli, 2003), lo que provocaría bajo consumo de alimentos.

7.2. Cambios en el eje hipotalámico-pituitario-tiroideo.

7.2.1. Grupo sal y grupo pareado.

El contenido de TRH hipotalámico no cambió en los grupos sal y el grupo pareado con respecto al control o entre ellos. Sin embargo, al analizar el contenido de TRH en la eminencia media (terminales de las neuronas del NPV donde el TRH es almacenado) observamos un aumento en el grupo pareado con restricción alimentaria, esto nos sugiere que el péptido no se está liberando y se corroboró con la disminución en la concentración de TSH sérico, esto se interpretaría como reducción de la tasa metabólica, a diferencia del grupo sal en el cual más bien se observó activación del eje tiroideo; esta reducción de la tasa metabólica fue observada por de Gortari *et al.* (2000a) en ratas adultas sometidas a 48 h de ayuno y en restricción alimentaria por 7 semanas. La falta de adaptación del eje HPT por la baja disponibilidad de alimentos, observada en la anorexia ya se había observado en ratas recién destetadas durante restricción alimentaria (de Gortari *et al.* 2000a).

La aparente liberación continua de TRH en la eminencia media en el grupo sal, así como el aumento de TSH sérico, sugieren que la síntesis de TRH en el NPV no está disminuida como se observó en el grupo de restricción alimentaria y después de 72h de ayuno (Blake *et al.*, 1991); esta constante liberación de TRH, podría apoyar el papel de TRH como anoréxico o como un regulador de la homeostasis energética, ya que estas ratas deshidratadas dejan de consumir alimento voluntariamente, además de que muestran activación del eje tiroideo en condiciones de baja disponibilidad de alimentos, a diferencia de lo observado en el grupo pareado.

Estudios previos han demostrado que la leptina puede modificar directa e indirectamente la síntesis y liberación de TRH en el NPV del hipotálamo (Nillni *et al.*, 2000), ya sea por la acción sobre sus receptores en neuronas que producen TRH o por medio de sus proyecciones del NArc al NPV; la administración de leptina previene la reducción de RNAm de proTRH en el NPV y restablece los niveles de hormonas tiroideas en ratas ayunadas (Legradi *et al.*, 1997). En nuestro estudio, la región hipotalámica estudiada involucra, además del NPV otros núcleos, por lo que no podríamos relacionar un efecto directo de la disminución de leptina observada en los grupos sal y pareado en neuronas de TRH del NPV; sin embargo, la liberación de TRH solo disminuyó en el grupo pareado y no en el grupo sal, lo que nos sugiere que la leptina solo tuvo un efecto inhibitorio en el grupo sometido a restricción alimentaria. En ratas deshidratadas así como, en las sometidas a restricción alimentaria se presenta reducción en la concentración de leptina y un aumento en el RNAm de NPY en el núcleo arcuato (NArc) (Watts *et al.*, 1999). El NPY inhibe neuronas TRHérgicas del NPV por medio de sus proyecciones del NARC (Légradí y Lechan, 1998; Fekete *et al.*, 2002), provocando así la inhibición de la síntesis y liberación de TRH; esto difiere con lo que ocurrió en el grupo sal donde la respuesta a NPY del NPV podría estar bloqueada ya que sí se observó liberación de TRH; esto evidencia que la señalización de leptina directa hacia el NPV y/o la del NPY al NPV parece estar bloqueada en la deshidratación.

En animales deshidratados, la activación del eje HPT podría ser debido a que proyecciones de neuronas CRHérgicas del hipotálamo lateral que van hacia el NPV ejercen un efecto sobre neuronas TRHérgicas en este núcleo, ya que a diferencia de las ratas sometidas a 5 días de restricción alimentaria, las ratas deshidratadas presentan aumento en los niveles de RNAm de CRH del hipotálamo lateral (Watts *et al.*, 1999) lo que podría ejercer un efecto diferencial sobre los receptores de CRH localizados en el NPV como lo es el receptor CRH-R2, el cual está involucrado principalmente en la ingesta de alimentos (Lu *et al.*, 2003); lo que podríamos corroborar si las neuronas de TRH expresan el receptor de CRH-R2.

La reducción en el TSH sérico, como se observó en el grupo pareado, se presenta al mismo tiempo que el aumento en los niveles de corticosterona en condiciones de ayuno y restricción alimentaria en ratas adultas (de Gortari *et al.*, 2000; Van Haasteren *et al.*, 1996); esta reducción de TSH podría ser a causa de la acción de los glucocorticoides (GC) sobre la expresión de TRH en el NPV y consecuentemente inhibir su liberación. Ratas adrenalectomizadas que ingieren soluciones de corticosterona y dexametasona (análogo a corticosterona) presentan reducción del RNAm de proTRH en el NPV (Kakucska *et al.*, 1995) a través de la acción directa de los GC sobre sus receptores localizados en este núcleo hipotalámico (Cintra *et al.*, 1990), esto se corrobora con las secuencias consenso similares de los sitios de unión de éstos receptores en el gen de TRH, lo que provee un sustrato molecular de acción directa de los GC sobre neuronas de TRH (Lee *et al.*, 1988).

La actividad enzimática de tiro liberinasa en suero aumenta en pacientes obesos y está correlacionada con el IMC, independientemente del estado tiroideo (Friedman *et al.*, 1995). En nuestro experimento se observó un resultado diferente ya que en los grupos de ratas con menor peso (sal y pareado) hubo aumento en la actividad de esta enzima; el metabolito o producto final de la actividad de esta enzima, el ciclo (His-Pro), se ha propuesto como regulador de la ingesta de alimentos actuando como inhibidor de esta conducta o anoréxico (Kow y Pfaff, 1987, 1991). El aumento en la actividad de tiro liberinasa que aparece en el grupo sal y en el grupo pareado no parece ser el responsable de la diferente conducta de ingesta de alimentos en los animales; en el grupo sal, el aumento en la actividad de tiro liberinasa posiblemente sea un efecto compensatorio por la liberación de TRH aumentada. En el grupo pareado, la reducción de las hormonas tiroideas, ampliamente reportado en la restricción alimentaria (Blake *et al.*, 1991; Rondell *et al.*, 1992), probablemente sea lo que active el aumento en la actividad de tiro liberinasa para degradar TRH en suero y así contribuir a la reducción de la tasa metabólica en este grupo. La diferencia significativa observada entre ambos grupos podría contribuir a que en el grupo sal se presente a una menor velocidad una posible reducción de la tasa metabólica como la que presentó el grupo pareado.

7.2.2. Grupo etanol y grupo glucosa

El efecto del etanol sobre el eje tiroideo depende de la cantidad, tiempo y vía de administración del etanol, así como de diferencias de género. Estudios previos de nuestro laboratorio indican diferencias entre ratas macho y hembra adultas sometidas al consumo crónico de una solución de etanol al 20%: reducción en los niveles de TSH en ratas macho a las 3 semanas de consumo de la solución de etanol, despuntando en un aumento a las 8 semanas, diferente a lo observado en las hembras donde se observa una reducción de TSH sólo en la 6ª semana (de Gortari *et al.*, 2004). Además la inyección i.p. de etanol (3 g/kg peso) provoca la reducción de TSH sólo después de 1 hora de su aplicación en ratas macho adultas, sin modificar el contenido de TRH hipotalámico (de Gortari *et al.*, 2000b).

El consumo de una solución de etanol al 20% no provocó cambios en el contenido de TRH en el hipotálamo de nuestras ratas púberes, aunque se observó la falta de adaptación del eje tiroideo por el bajo consumo de alimentos, esto debido a la aparente liberación de TRH en la eminencia media que se corrobora con la ausencia de la reducción de TSH sérico, sugiriendo así que la síntesis de TRH en el NPV no está disminuida. La falta de adaptación del eje tiroideo en el grupo etanol difiere en lo observado en el grupo glucosa, lo que pudo contribuir a la diferencia en peso entre el grupo etanol y el grupo glucosa; además por la aparente continua liberación de TRH en el grupo etanol, no podríamos descartar el papel que tiene TRH como anorexigénico o en la regulación de la homeostasis energética, ya que este grupo es de los que dejan de consumir alimento de manera voluntaria.

El grupo etanol no presentó cambio significativo en los niveles de leptina con respecto al grupo control; los resultados concuerdan con Strbák *et al.* (1998) quienes observaron cambios en la concentración de leptina sérica en ratas púberes sometidas al consumo de una solución de etanol al 10%; además en ratas adultas sometidas al consumo de una solución de etanol al 20%, así como también individuos alcohólicos, se observa la tendencia a aumentar sus niveles de leptina sérica (Jaimes, 2003; Nicolás *et al.*, 2001); estas observaciones nos permiten suponer que los animales púberes sometidos al consumo de una

solución de etanol no tienen hambre, lo que provocó que los animales dejaran de consumir alimento.

El grupo glucosa no modificó sus niveles séricos de corticosterona, en cambio el grupo etanol mostró aumento en este parámetro en las ratas púberes, a diferencia de lo que se observa en ratas macho a la misma edad y que consumieron una solución de etanol al 10% por 4 semanas (Strbák *et al.*, 1998), a pesar de haber estado sometidas por más tiempo al efecto del etanol. Esto nos podría indicar que la diferencia de género podría ser un factor determinante en el efecto del etanol sobre el eje adrenal; en ratas hembras intactas y machos (castrados tratados con estradiol) inyectadas con etanol (3 g/kg peso) se aumenta la secreción de ACTH; en cambio, en ratas macho intactas no se observa esta respuesta. Esto nos muestra el efecto de los esteroides gonadales por el consumo de etanol, específicamente del estradiol (Ogilvie y Rivier, 1997); además de estos resultados en ratas hembras adultas sometidas a una solución de etanol al 20% por 7 días no se observa aumento en los niveles de corticosterona (Jaimes, 2003), proponiendo así que la diferencia de edad es otro de los factores que modifican el efecto del etanol sobre el eje adrenal, siendo las ratas adolescentes más susceptibles a los efectos del consumo de etanol. La adaptación del eje tiroideo observada en el grupo glucosa probablemente fue lo que permitió que estas ratas no perdieran peso a pesar de haberlas sometido a restricción de alimentos, esta adaptación reduce la tasa metabólica (Van Haasteren *et al.*, 1996) por la reducción de la liberación de TRH en este grupo.

7.3. Cambios en el contenido de TRH en el sistema límbico.

Las variaciones en el contenido de TRH en los diferentes tejidos después de diferentes estímulos reflejan el resultante de la síntesis y liberación de este péptido; en el sistema límbico, la estimulación eléctrica de la amígdala aumenta los niveles de RNAm de pro-TRH que son correlacionados con actividad epileptogénica (de Gortari *et al.*, 1998); además, ratas expuestas al frío y a la succión presentan aumento en el contenido de RNAm de TRN en el NPV (Zoeller *et al.*, 1990; Uribe *et al.*, 1993); esto nos sugiere que cambios en los niveles de TRH representan una respuesta de activación de las neuronas TRHérgicas.

Para definir si el TRH participa en el sistema límbico en aspectos relacionados a la conducta alimentaria, analizamos si los cambios en el contenido de TRH ocurren de manera diferencial en los diferentes modelos de anorexia y sus grupos pareados respectivos (grupo sal vs. grupo pareado y grupo etanol vs. grupo glucosa) en regiones involucradas en el control de la conducta alimentaria.

7.3.1. Corteza frontal

La actividad neuronal de esta región depende del estado de hambre o saciedad, ya que las respuestas (como cambios en la tasa de disparo neuronal y en estudios de neuroimagen) en la corteza orbitofrontal durante el ayuno son inhibidas después de la saciedad (Critchley y Rolls, 1996; Morris y Dolan, 2001). Esta región recibe proyecciones de áreas visuales del lóbulo temporal, relacionándola así con la percepción de características organolépticas de los alimentos como la textura (Critchley *et al.*, 1993; Critchley y Rolls, 1996; Rolls, 2004a, 2004b). Además, se observa actividad de esta región en cerebro humano por efecto de sabores agradables o desagradables (O'Doherty *et al.* 2001; Rolls 2004a, 2004b) e interactuando con la amígdala, la corteza frontal participa en la toma de decisiones sobre la selección o preferencia de alimentos (Baylis y Gaffan, 1991; Bechara *et al.*, 1999; Rolls, 2000).

En el grupo sal (modelo de anorexia por deshidratación), así como en su grupo pareado de restricción alimentaria, no observamos la activación de neuronas TRHérgicas sobre la corteza frontal, por lo que TRH no participa en la regulación de la conducta alimentaria en esta región bajo estos parámetros experimentales.

El etanol disminuyó el contenido de TRH en la corteza frontal (que se interpretaría como la liberación del péptido) difiriendo de los grupos control y glucosa; este cambio en el contenido de TRH nos sugiere la participación de neuronas TRHérgicas en esta región sobre algún aspecto de la ingesta de alimentos; además esta disminución en el contenido de TRH fue similar a la encontrada en ratas adultas que reducen su consumo de alimento al

estar sometidas al consumo de etanol (Jaimes, 2003). En ratas macho adultas, a las 6 semanas de ingesta de la misma solución, también disminuye el consumo de alimento y el contenido de TRH en esta región (de Gortari 2005), por lo que podríamos suponer que el etanol afecta selectivamente a neuronas TRHérgicas de la corteza frontal, ya que esta región se considera una de las principales regiones donde el etanol ejerce su efecto (Koob *et al.*, 1998) al estar involucrada en funciones cognitivas (O'Doherty *et al.* 2001; Rolls, 2000, 2004a, 2004b). El sabor del etanol es desagradable para las ratas y se asocia con la reducción de la ingesta de alimentos (Piano *et al.*, 2001), este sabor desagradable podría provocar la activación de neuronas en la corteza frontal ya que participan en el reconocimiento de sabores agradables o desagradables (O'Doherty *et al.* 2001).

7.3.2. Corteza insular

La actividad de la corteza insular se relaciona con el reconocimiento de sabores nuevos o desconocidos (Rosenblum, 1993, 1995) y, como respuesta a la actividad observada en esta región, se activan mecanismos para la codificación de la memoria de sabores como la fosforilación de tirosina y síntesis de proteínas (Rosenblum, 1993, 1995). Además, la corteza insular responde al consumo de soluciones de sal y de glucosa, aumentando la tasa de disparo de sus neuronas y la activación de proteínas quinasas; esta activación también participa en la codificación de la memoria de sabores (Berman *et al.*, 1998; Hanamori *et al.*, 1998).

En el modelo de anorexia por deshidratación no observamos cambios en el contenido de TRH en nuestras ratas púberes. Aunque no fue significativa, la aparente liberación de TRH en el grupo pareado (interpretado por la reducción de su contenido) fue similar a lo que se observa en ratas adultas sometidas a esta misma condición de restricción alimentaria (Jaimes, 2003); podríamos suponer que bajo condiciones de restricción alimentaria los mecanismos de reconocimiento de nuevos sabores se activan, a diferencia del grupo deshidratado donde la sal podría inducir la inhibición de las vías TRHérgicas. Las neuronas TRHérgicas del grupo sal y del grupo glucosa no respondieron al consumo de éstas

soluciones, a pesar de que se reporta actividad neuronal en la corteza insular debido a su consumo (Berman *et al.*, 1998; Hanamori *et al.*, 1998).

En el grupo etanol se observó un efecto específico sobre neuronas TRHérgicas por el consumo de ésta solución, difiriendo significativamente del grupo control y el grupo glucosa; por lo que no podríamos descartar que las neuronas de TRH respondan específicamente al sabor del etanol en la corteza insular. Es interesante mencionar que el consumo de etanol únicamente causó una respuesta diferencial sobre las neuronas TRHérgicas de la corteza frontal e insular (disminuyendo y aumentando el contenido de TRH respectivamente), esto nos permite suponer que TRH está implicado directamente sobre funciones cognitivas (corteza frontal) relacionadas probablemente con la conducta alimentaria y en el reconocimiento de sabores (corteza insular).

7.3.3. Amígdala.

La amígdala se relaciona con la regulación de la conducta de ingesta de alimentos y el control de peso (Ahn y Phillips, 2002; Morris y Dolan, 2001), da valor emocional al consumo de alimentos (Kesner *et al.*, 1989; Ono *et al.*, 1995; Uwano *et al.*, 1995), además de ser sensible a respuestas inducidas por estrés, implicándola así en conductas tipo ansiosas (Vyas *et al.*, 2002). La interacción corteza frontal-amígdala se relaciona con el comportamiento de la toma de decisiones sobre la selección de alimentos (Bechara *et al.*, 1999; Rolls, 2000) y al igual que en la corteza frontal, se observa actividad en la amígdala de cerebro humano (por estudios de resonancia magnética y tomografía de emisión de positrones) por el efecto de percepción de sabores agradables como el de glucosa, o desagradables como el de la sal (Berthoud, 2002; O'Doherty *et al.* 2001); además la actividad neuronal en la amígdala se implica en diferentes trastornos psiquiátricos como la depresión y trastornos obsesivos-compulsivos, (Breiter *et al.*, 1996; Drevets, 2003; Nestler *et al.*, 2002; Vyas *et al.*, 2002).

El contenido de TRH de la amígdala en ratas púberes sometidas al modelo de anorexia por deshidratación se redujo con respecto al grupo control; ésta reducción se observa en ratas

adultas sometidas al mismo modelo de anorexia (Jaimes, 2003). Puesto que el grupo sal y el grupo pareado presentaron la misma tendencia a reducir su contenido de TRH en amígdala y son similares entre sí, es probable que neuronas TRHérgicas no participen en la anorexia inducida por deshidratación, sino que sea una respuesta ante alteraciones metabólicas, ya que se observa un aumento en el contenido de TRH en esta región por el efecto de 48h de ayuno (de Gortari *et al.*, 2000a).

El contenido de TRH en el grupo etanol no se modificó significativamente del grupo control, aunque sí difirió de lo observado en el grupo glucosa. Cambios en el contenido de TRH por el efecto del alcohol en la amígdala se observan en ratas adultas 6h después de la administración aguda de etanol, regresando a niveles basales a las 24h (de Gortari *et al.*, 2000b), esto nos sugiere que probablemente pudo presentarse un cambio en el contenido de TRH en la amígdala de ratas púberes previo a los 5 días de consumo de etanol, pero este cambio fue transitorio, o pudo haberse presentado desensibilización de las neuronas TRHérgicas, ya que por ejemplo la administración intraperitoneal de alcohol (3 g/kg de peso) por 17 a 24 días reducen la inmunoreactividad de proteína Fos (Chang *et al.*, 1995); por lo que el etanol activa neuronas de la amígdala en ratas pero el efecto se pierde con repetidas dosis de etanol. El grupo glucosa aumentó significativamente su contenido de TRH en la amígdala de ratas púberes con respecto al grupo control; este aumento se observa también en ratas hembras adultas sometidas al consumo de una solución de glucosa durante 6 semanas (de Gortari, 2005) y en ratas que consumieron glucosa durante la gestación y la lactancia (de Gortari, 2002). Este aumento en el grupo glucosa sobre el contenido de TRH en la amígdala no podría atribuirse a cambios metabólicos por la restricción alimentaria ya que el consumo de etanol no provocó cambios; este aumento podría ser por un efecto directo debido a su consumo, ya que la amígdala contiene neuronas que responden directamente al efecto de la glucosa, por medio de canales K^+ sensibles a ATP (Dunn-Meynell *et al.*, 1998; Levin *et al.*, 1999).

Entre las diversas funciones en que se implica a la amígdala, se le considera un importante componente de los sistemas que involucran respuestas al miedo (Heilman y Gilmore, 1998; LeDoux, 2000). En pacientes con anorexia nervosa, cuando se les confronta con su imagen

corporal, presentan respuestas en la amígdala derecha activando así redes neuronales implicadas con el miedo (Seeger *et al.*, 2002); esta activación de la amígdala, así como un aumento del volumen de esta región también se observa en pacientes con desórdenes de ansiedad (de Bellis *et al.*, 2000; Breiter *et al.*, 1996). Además, las ratas con lesiones en esta región presentan alteraciones en la selección de alimentos (Borsini y Rolls, 1984) ya que no evitan ingerir un alimento que previamente les provocó algún daño o malestar. Posiblemente, las diferentes respuestas en las neuronas TRHérgicas entre el grupo sal y el grupo glucosa pudieran estar implicadas en el reconocimiento de sabores que pudieran provocarles algún efecto nocivo a estos animales.

7.3.4. Hipocampo

El hipocampo es una región ampliamente relacionada con el aprendizaje y la memoria (Horita, *et al.*, 1989; Jarrard, 1993; Kupferman y Kandell, 1995) es además, una región susceptible al estrés ya que el aumento de corticosteroides provoca cambios morfológicos en dendritas de células CA3 (Wolley *et al.*, 1990), esto también sucede en ratas sometidas al modelo de estrés por inmovilización (Vyas *et al.*, 2002). El hipocampo se ha implicado además en aspectos motivacionales sobre la ingesta de alimentos (Davidson y Jarrard, 1993; Jarrard, 1973; Tracy *et al.*, 2001) y se considera como un centro de monitoreo de la calidad de nutrimentos debido a la presencia de receptores de insulina en esta región (Unger, *et al.*, 1991).

La restricción alimentaria y la deshidratación provocaron diferentes respuestas en cuanto al contenido de TRH; en el grupo pareado se observó un aumento en el contenido del péptido mientras que en el grupo sal no se presentaron cambios. No podemos descartar que posiblemente la deshidratación pudo provocar un efecto inhibitorio sobre las neuronas TRHérgicas hipocampales, por medio de la pérdida del tono inhibitorio del hipocampo hacia el hipotálamo debido al efecto del estrés crónico (que se sabe, lo bloquea) y del cual el grupo pareado respondió de manera diferente, a pesar del mismo aumento de corticosterona en ambos grupos. El aumento en el contenido de TRH debido a la falta de alimento (como se observó en el grupo pareado), se ha reportado previamente en ratas

adultas sometidas a restricción alimentaria por 7 días (Jaimes, 2003), así como también en ratas infantas sometidas a 48h de ayuno (de Gortari *et al.*, 2000a). La falta de alimento deriva en daños sobre funciones hipocampales, ya que debido a esta condición se observa en animales alteraciones en el comportamiento y funciones cognitivas (Strupp y Levitsky, 1995); así como daños en los procesos de memoria y aprendizaje en pacientes desnutridos, donde el hipocampo está ampliamente implicado (Brown y Pollit, 1996).

El grupo sometido al consumo de una solución de etanol así como también el grupo glucosa no presentaron cambios en el contenido de TRH en el hipocampo con respecto al grupo control; lo que nos permitiría suponer que TRH no participa en la regulación de la conducta alimentaria en esta región, bajo estos parámetros experimentales.

7.3.5. *Núcleo accumbens*

El núcleo accumbens es una región límbica relacionada con mecanismos de recompensa (Carelli *et al.*, 2000) y en la actividad motora, donde además se implica la participación de TRH y dopamina (Miyamoto y Nugawa, 1977; Sharp *et al.*, 1984; Yamamura *et al.*, 1991); además, el núcleo accumbens responde a alteraciones metabólicas inducidas por estrés (Hajnal *et al.*, 2000).

En el grupo sometido al modelo de anorexia por deshidratación así como en el grupo pareado sometido a restricción alimentaria, no se observaron cambios significativos contra el grupo control en el contenido de TRH del núcleo accumbens; por lo que TRH no participa en aspectos sobre el control de la conducta alimentaria mediados por esta región. El grupo sometido al consumo de una solución de etanol así como también el grupo glucosa no presentaron cambios en el contenido de TRH en el núcleo accumbens con respecto al grupo control; lo que nos permitiría suponer que TRH no participa en la regulación de la conducta alimentaria en esta región.

8. Conclusiones.

1. En los modelos de anorexia (grupos sal y etanol) disminuyó la ingestión de alimentos de manera voluntaria, provocando la pérdida de peso corporal y una activación del eje tiroideo con la constante liberación de TRH al compara contra sus controles experimentales, por lo que no podríamos descartar el papel de TRH como anorexigénico o regulador de la homeostásis energética en estos modelos.
2. En modelos de restricción alimentaria (grupo pareado y grupo glucosa) se presentó adaptación del eje tiroideo, provocando la reducción de la tasa metabólica y la reducción de la liberación de TRH.
3. En la deshidratación y en la restricción alimentaria, el bajo contenido de leptina en suero, implica que la leptina no fue un factor determinante para que los animales dejaran de consumir alimento de manera voluntaria.
4. El hipocampo es la única región límbica donde se observó un efecto específico de la deshidratación, ya que provocó la inhibición de la actividad de neuronas TRHérgicas, sugiriendo así la participación de TRH de esta región en el control de la conducta alimentaria.
5. El consumo de una solución de etanol provocó cambios específicos sobre neuronas TRHérgicas en la corteza frontal y la corteza insular, implicando así a TRH en funciones cognitivas y sobre el reconocimiento de sabores novedosos, respectivamente.

9. Perspectivas.

Los cambios observados en el contenido de TRH en el sistema límbico de ratas asdolescentes, no son indicativos del aumento o disminución de su síntesis, por ello se recomienda cuantificar la concentración de RNAm en las diferentes regiones estudiadas y de manera conjunta medir la actividad de PPII para la degradación del péptido. Además para determinar si las vías TRHérgicas son inhibidas o activadas en los diferentes modelos experimentales que realizamos, es necesaria la cuantificación de los receptores de TRH.

10. Referencias.

- Ahn, S. y Phillips, AG. Dopaminergic correlates of sensory-specific satiety in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of the rat. *Journal of Neuroscience* 1(19): 49-56. 1999.
- Akil, H., Campeau, S., Cullinan, W., Lechan, R., Toni, R., Watson, S. y Moore, R. 1999 Neuroendocrine systems I: overview-thyroid and adrenal axes. En: Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J. y Squire, L. *Fundamental neuroscience.* Academic press, U.S.A., pp. 1127-1147.
- Aleman, M. 2003 Mecanismos de control de peso corporal implicaciones en la anorexia nerviosa. En: Rojo, L. y Cava, G. *Anorexia nerviosa.* Ariel, España, pp. 69-85.
- Argente, J. Niveles plasmáticos de leptina en pacientes con anorexia nerviosa y bulimia nerviosa. *Revista de la Asociación para el Estudio de los Trastornos de la Conducta Alimentaria.* 1(4): 4-5. 1999.
- Backberg, M., Ultenius, C. y Fritschy, JM. Cellular localization of GABA_A receptor alpha-subunit immunoreactivity in the rat hypothalamus: relationship with neurons containing orexigenic or anorexigenic peptides. *Journal. of Endocrinology* 16: 589-604. 2004.
- Bahls, SC. y Amaral de Carvalho, G. The relation between thyroid function and depression: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 26(1): 40-8. 2004.
- Bauer K, Nowak, P. y Kleinkauf, H. Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thyroliberin at pyroglutamyl-histidine bone. *European Journal of Biochemistry* 118(1): 173-6. 1981.
- Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): regulation of a membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 70: 69-74. 1988.
- Baylis, LL. y Gaffan, D. Amygdectomy and ventromedial prefrontal ablation produce similar deficits in food choice and in a simple object discrimination learning for an unseen reward. *Experimental Brain Research* 86(3): 617-22. 1991.
- Bear, M., Connors, B. y Paradiso, J. 1996. Neuroscience: Exploring the brain. Williams and Wilkins, Canada, pp. 437-441.
- Beato, L., Rodríguez, T. y Belmonte, A. Experiencias disociativas en pacientes con trastornos alimentarios. *Revista de la Asociación para el Estudio de los Trastornos de la Conducta Alimentaria.* 1(4): 1-3. 1999.

- Bechara, A., Damasio, H., Damasio, A. y Lee, G. Different contributions of the human amygdala and ventromedial prefrontal cortex to decision-making. *Journal of Neuroscience*. 19(13): 5473-5481. 1999.
- Bennett, GW., Green, AR. y Marsden, CA. Changes in the behavioral response to a TRH analogue following chronic amitriptyline treatment and repeated electroconvulsive shock in the rat. *British Journal of Pharmacology* 88: 129-139. 1986.
- Berman, D., Hazvi, S., Rosenblum, K., Seger, R. y Dudai, Y. Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *Journal of Neuroscience* 18(23): 10037-10044. 1998.
- Berthoud, HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 26: 394-428. 2002.
- Bittencourt, JC., Presse, F., Arias C., Peto, C., Vaughen, J., Nahon, JL., Vale, W. y Sawchenko, PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *Journal of Comparative Neurology* 319: 218-235. 1992.
- Blake, N., Eckland, D., Foster, O. y Lightman, S. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129(5): 2714-2718. 1991.
- Blundell, J. 1993 Regulation and dysregulation in the appetite control system. En: Lehnert, Marison y Weiner. *Endocrine and nutritional control of basic biological functions*. Hogrefe and Huber, U.S.A., pp. 87-96.
- Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M y Ryan, I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(9): 3419-3423. 1996.
- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C. y Shally, AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyro-glutamyl-histidil-proline amide. *Biochemical Biophysical Research Communications* 37:705-710. 1969.
- Borsini, F., y Rolls, ET. Role of noradrenaline and serotonin in the basolateral region of the amygdala in food preferences and learned taste aversions in the rat. *Physiology and Behavior* 33(1): 37-43. 1984.
- Borrego, O. Tratamiento de los trastornos de la conducta alimentaria: anorexia y bulimia. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 24(2): 44-50. 2000.
- Bousoño, M. 2003 Consecuencias de la anorexia nerviosa. En: Rojo, L., Cava, G. *Anorexia nerviosa*. Ariel, España, pp. 112-124.
- Breiter, HC., Rauch, SL., Kwong, KK., Baxter, JR., Weisskoff, RM., Kennedy, DN., Kendrick, AD., Davis, TL., Jiang, A., Cohen, MS., Stern, CE., Belliveau, JW., Baer, L., O'Sullivan, RL., Savage, CR., Jenite, MA. y Rosen, BR. Functional magnetic resonance imaging of symptom provocation in obsessive-compulsive disorder. *Archives of General Psychiatry* 53(7): 595-606. 1996.
- Breese, GR., Cott, JM., Cooper, BR., Prange, AJ., Lipton, MA y Plotnikoff, NP. Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on the actions of pentobarbital and other centrally acting drugs. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 193 (1): 599-609. 1975.
- Breese, GR., Coyle, S., Towle, AC., Mueller, RA., McCown, TJ. y Frye, GD. Ethanol-induced locomotor stimulation in rats after thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 229: 731-737. 1984.
- Broberger, C. y Hokfelt, T. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiology and Behavior* 74: 669-687. 2001.
- Brown, JL. y Pollit, E. Malnutrition, poverty and intellectual development. *Scientific American* 274(2): 38-43. 1996.
- Burgus, R., Dunn, TF., Desiderio, D., Vale, W., Guillemin, R., Derives polypeptidiques de synthèses douces d'activité hypophysiotrope TRF. *Comptes Rendus Academic des Sciences (Paris)* 269: 226-228. 1969.

- Cao, J., O'Donnell, D., Vu, H., Payza, K., Pou, C., Godbout, C., Jacob, A., Pelletier, M., Lembo, P., Ahmad, S. y Walker, P. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* 273(48): 32281-32287. 1998.
- Carballo, G., Verdeja, O. y Santana, F. Leptina y reproducción (enfoque actual). *Revista Cubana Endocrinología* 10(3): 191-97. 1999.
- Cardinal, R., Parkinson, J., Hall, J. y Everitt, B. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neuroscience and Behavioral* 26: 321-352. 2002.
- Carelli, RM., Ijames, S. y Crumling, A. Evidence that separates neural circuits in the nucleus accumbens encode cocaine versus "natural" water and food reward. *Journal Neuroscience* 20: 4255-4266. 2000.
- Carey, MP., Deterd, CH., de Koning, J., Helmerhorst, F. y de Kloet, ER. The influence of ovarian steroids on hypothalamic-pituitaryadrenal regulation in the female rat. *Journal of Endocrinology* 144: 311-21. 1995.
- Chang, SL., Patel, NA. y Romero, AA. Activation and desensitization of Fos immunoreactivity in the rat brain following ethanol administration. *Brain Research* 679: 89-98. 1995.
- Charli, J.L., Cruz, C., Vargas, MA. y Josphe-Bravo, P. The narrow specificity of pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochemistry International* 13: 237-242. 1988.
- Choi, Y., Hartzell, D., Azain, M. y Baile, A., TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiology and Behavior* 77: 1-4. 2002.
- Cintra, A., Fuxe, K., Wikstrom, A., Visser, T. y Gustafsson, J. Evidence for thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in various preoptic and hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Research* 506: 139-144. 1990.
- Ciosek, J. Vasopressin and oxytocin release as influenced by thyrotropin-releasing hormone in euhydrated and dehydrated rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 53(3): 423-437. 2002.
- Cohen, R., Malloy, P. y Jenkins, M. 1998 Disorders of attention. En: Sneider, P. y Nussbaum, P. (eds.) *Clinical neuropsychology* American Psychological Association, Washington. pp.541-572.
- Collier, D. y Treasure, J. The aetiology of eating disorders. *British of Journal of Psychiatry* 185: 363-365. 2004.
- Collins, GB., Brosnihan KB., Zuti, RA., Messina, M. y Gupta, MK. Neuroendocrine, fluid balance, and thirst responses to alcohol in alcoholics. *Alcohol Clinical Experimental Research* 16: 228-233. 1992.
- Connan, F., Campbell, I., Katzman, M., Lightman, S. y Treasure, J. A neurodevelopmental model for anorexia. *Physiology and Behavior* 79: 13-24. 2003.
- Cott, JM., Bresse, GR., Cooper, BR., Barlow, S. y Prange, AJ. Investigations into the mechanism of reduction of ethanol sleep by thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 196(3): 594-604. 1976.
- Critchley, HD., Rolls, ET. Y Wakeman, EA. Orbitofrontal cortex responses to the texture, taste, smell and sight food. *Appetite* 21(171). 1993.
- Critchley, HD. y Rolls, ET. Hunger and satiety modify the responses of olfactory and visual neurons in the primate orbitofrontal cortex. *Journal Neurophysiology* 75(4): 1673-86. 1996.
- Croxson, M. e Ibbertson, H. Low serum triiodothyronine (T3) and hypothyroidism in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 44 (1): 167-174. 1977.
- Cupples, W. Peptides that regulate food intake. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284: 1370-1374. 2003.
- Dahl, G., Evans, N., Thrun, L. y Karsch, F. A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 135(6): 2392-2397. 1994.

- Davidson, TL. y Jarrard LE. A role for hippocampus in the utilization of hunger signals. *Behavioral and Neural Biology* 59(2): 167-71. 1993.
- de Bellis, MD., Casey, BJ., Dahl, RE., Birmaher, B., Williamson, DE., Thomas, KM., Axelson, DA., Frustaci, K., Boring, AM., Hall, J. y Ryand, ND. A pilot study of amygdala volumes in pediatric generalized anxiety disorder. *Biological Psychiatry* 48(1): 51-57. 2000.
- de Gortari, P., Joseph-Bravo, P., Monroy-Ruiz, J., Martínez. A., Cisneros, M. y Fernández Guardiola, A. Brain thyrotropin-releasing hormone content varies through amygdaloid kindling development according to afterdischarge frequency and propagation. *Epilepsia* 39: 897-903. 1998.
- de Gortari, P., González-Alzati, ME., Cisneros, M. y Joseph-Bravo, P. Effect of fasting on the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamil peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nutritional Neuroscience* 3: 255-265. 2000^a.
- de Gortari, P., Mendez, M., Rodríguez-Keller, I., Pérez-Martínez y Joseph-Bravo, P. Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochemistry International* 37: 483-496. 2000b.
- de Gortari, P., Cisneros, M., Medellín, MA. y Joseph-Bravo, P. Chronic ingestion of ethanol or glucose solutions affects hypothalamic and limbic TRH metabolism in dams and their pups. *Neurochemistry International* 41: 237-349. 2002.
- de Gortari, P., Cisneros, M. y Joseph-Bravo, P. Chronic ethanol or glucose consumption alter TRH content and proglutamyl aminopeptidase II activity in rat limbic regions. *Regulatory Peptides* 127(1-3): 141-150. 2005.
- de Lecea, L., Kilduff, TS., Peyron, C., Foye, PE., Danielson, PE., Fukuhara, C., Buttenberg, EL., Gautvik, VT. y Bartlett, FS. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with excitatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 322-327. 1998.
- Demeester-Mirkine, N. y Dumont J. 1980 The hypothalamo-pituitary thyroid axis. En: De Visscher M. *The thyroid gland*. Raven press, New York, pp. 145-152.
- Drevets, WC. Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences* 985: 420-44. 2003.
- Duun-Meynell, A., Rawson, NE y Levin, BE. Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K⁺channel in rat brain. *Brain Research* 814(1): 41-54. 1998.
- Eckert, E., Pomeroy, C., Raymond, N., Kohler, P., Thuras, P. y Bowers, C. Leptin in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83 (3): 791-795. 1998.
- Egli, M. Peptides: their role in excess alcohol drinking and their promise as a therapeutic tool. *Physiology and Behavior* 79(1): 89-93. 2003.
- Eiper, BA. y Mains, RE. Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphine and related peptides. *Endocrine Reviews* 1: 1-27. 1980.
- Eisenhofer, G. y Johnson, RH. Effect of ethanol ingestion on plasma vasopressin and water balance in humans. *American Journal of Physiology* 242(5): 522-7. 1982.
- Fekete, C., Légrádi, G., Mihály, E., Huang, Q., Tatro, J., Rand, W., Emerson, C. y Lechan, R. α -melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *Journal of Neuroscience* 20(4): 1550-1558. 2000.
- Fekete, C., Kelly, J., Mihály, E., Sarkar, S., Rand, W., Légrádi, G., Emerson, C. y Lechan, R. Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142(6): 2606-2613. 2001.
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W., Harney, J., Emerson, C., Bianco, A. y Lechan, R. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the HPT axis: comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 143(10): 3846-3853. 2002.

- Friedman, T., Yanovski, J., Jayasvasti, V., Yanovski, S., Koenig, R. y Wilk, S. Pyroglutamyl peptidase-II ("Thyroliberinase") activity in human serum: influence of weight and thyroid status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80(4): 1086-1089. 1995.
- Fuse, Y., Polk, DH., Lam, RW. y Fisher, DA. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and precursor peptide (TRH-Gly) in rat adult tissues. *Endocrinology* 127: 2501-2505. 1990.
- García, S., Porto, P., Álvarez, A., Martínez, VN., Shaurli, D., Finkielman, S. y Pirola, C. Central overexpression of the TRH precursor gene induces hypertension in rats: antisense reversal. *Hypertension* 30: 759-766. 1997.
- Gary, K., Sevarino, K., Yarbrough, G., Prange, A. y Winokur, A. The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 305(2): 410-416. 2003.
- Gold, PW., Kaye, W., Robertson, GL. y Ebert, M. Abnormalities in plasma and cerebrospinal-fluid arginine vasopressin in patients with anorexia nervosa. *New England Journal of Medicine* 308: 1117-1123. 1983.
- González, L., Unikel, C., Cruz, C. y Caballero, A. Personalidad y trastornos de la conducta alimentaria. *Salud Mental* 26(3):18. 2003.
- Grinspoon, S., Gullick, T., Askari, H., Landt, M., Lee, K., Anderson, E., Ma, Z., Vignati, L., Bowsher, R., Herzog, D., y Klibanski, A. Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(11): 3861-3863. 1996.
- Griffiths, E. Thyrotropin-releasing hormone: endocrine and central effects. *Psycho Neuroendocrinology* 10: 225-235. 1985.
- Griffiths, E. Clinical applications of thyrotropin-releasing hormone. *Clinical Science* 73: 449-457. 1987.
- Hajnal, A., Székely, M., Gálosi, R. y Lénard, L. Accumbens cholinergic interneurons play a role in the regulation of body weight and metabolism. *Physiology and Behavior* 70: 95-103. 2000.
- Halmi, K. 2003 Genética y psicobiología de la anorexia nerviosa. En: Rojo, L. y Cava, G. *Anorexia nerviosa.* Ariel, España, pp. 87-92.
- Hanamori, T., Kunitake, T., Kato, K. y Kannan, H. Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *Journal of Neurophysiology* 79: 2535-2545. 1998.
- Hao, S., Avraham, J., Bonne, O. y Berry, E. Separation-induced body weight loss, impairment in alteration behavior, and autonomic tone: effects of tyrosine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 68: 273-281. 2001.
- Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C., Chandrankunnel, A., Nillni, E., Bjorbaek, C., Elmquist, J., Flier, J. y Hollenberg, A. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *Journal of Clinical Investigation* 107(1): 111-120. 2001.
- Havel, P. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine* 226(11): 963-977. 2001.
- Heilman, KM. y Gilmore, RL. Cortical influences in emotion. *Journal of Clinical Neurophysiology* 15(5): 409-23.1998.
- Heuer, H., Schafer, MK., O'Donnell, D., Walter, P. y Bauer, K. Expression on TRH-R2 in the central nervous system of rats. *Journal of Comparative Neurol* 428(2): 319-336. 2000.
- Houseknecht, K., Baile, K., Matteri, R. y Spurlock, M. The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Sciences* 76: 1405-1420. 1998.
- Hokfelt, T., Tsuruo, G., Ulfhake, B., Cullheim, S., Arvidsson, U., Foster, G., Schultzberg, M., Schalling, M., Arborelius, L. y Freedman, J. Distribution of TRH-like immunoreactivity with special coexistence with other neuroactive compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1: 76-105. 1989.

- Holtkamp, K., Herpertz-Dahlmann, B., Mika, C., Heer, M., Heussen, N., Fichter, M., Herpertz, S., Senf, W., Blum, W., Schweigener, U., Warnke, A., Ballauff, A., Remschmidt, H. y Hebrebrand, J. Elevated physical activity and low leptin levels co-occur in patients with anorexia nervosa. *The Clinical Endocrinology and Metabolism* 88(11): 5169-5174. 2003.
- Horita, A., Carini, M., Zabawska, J. y Lai, H. TRH-analog MK-771 reverse neurochemical and learning deficits in medial septal-lesioned rats. *Peptides* 10: 121-124. 1989.
- Jaimes, L. 2003 Metabolismo de la hormona liberadora de tirotrópina en modelos animales de anorexia y restricción alimentaria en regiones del sistema límbico. Tesis profesional. *Escuela de Dietética y Nutrición*, México, 65 pp.
- Jarrard, LE. The hippocampus and motivation. *Psychological Bulletin* 79: 1-12. 1973.
- Jarrard, LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology* 60(1): 9-26. 1993.
- Jéquier, E. y Tappy, L. Regulation of body weight in humans. *Physiological Reviews* 79(2): 451-480. 1999.
- Jonson, J., Cohen, P., Kasen, S., y Brook, J. Eating disorders during adolescence and the risk for physical and mental disorders during adulthood. *Archives of General Psychiatry* 59: 545-552. 2002.
- Joshep-Bravo, P., Uribe, R. y Charli, J.L. 1993 Biosíntesis de neuropéptidos y su regulación. En CONACYT. Comunicación neuroendócrina. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp. 15-30.
- Kakucska, I., Rand, W. y Lechan, RM. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by both triiodothyronine and thyroxine. *Endocrinology* 130: 2845-2850. 1992.
- Kakucska, I., Qi, Y. y Lechan, R. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 136(7): 2795-2802. 1995.
- Kalra, S., Dube, M., Pa, S., Xa, B., Horvath, T. y Kalra, P. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 20(1): 68-100. 1999.
- Kalivas, PW., Stanley, D. y Prang, AJ. Interaction between thyrotropin-releasing hormone and the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology* 26(1): 33-8. 1987
- Kandel, E y Kupfermann, I. 1995. Emotional states. En Kandell, E., Schwartz, J. y Jessell, T. (eds.) *Essentials of neural science and behavior.* Appleton and Lange, U.S.A., pp.595-612.
- Karydis, I. y Tolis, G. Orexin, anorexia and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid* 8(10): 947-950. 1998.
- Kaye, W. Anorexia nervosa, obsessional behavior, and serotonin. *Psychopharmacology Bulletin* 33(3): 335-344. 1997.
- Krahn, DD., Gosnell, BA., Levine, AS. y Morley, JE Behavioral effects of CRF: localization and characterization of central effects. *Brain Research* 443: 63-69. 1988.
- Kesner, RP., Walser, RD. y Winzenried, D. Central but not basolateral amygdala mediates memory for positive affective experiences. *Behavioral and Brain Research* 33(2): 189-95. 1989.
- Kim, MS., Small, C., Stanley, S., Morgan, D., Seal, L., Kong, W., Edwards, C., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M. y Bloom, S. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *Journal of Clinical Investigation* 105(7): 1005-1011. 2000.
- Kleeman, CR., Robini, ME., Lamdin, E. y Epstein, FH. Studies of alcohol diuresis II. The evaluation of ethyl alcohol as an inhibitor of the neurohypophysis. *Journal of Clinical Investigation* 34: 448-455. 1955.
- Koob, GF., Roberts, AJ., Schulteis, G., Parsons, LH., Heyser, CJ., Hyytia, P., Merlo-Pich, E. y Weiss, F. Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clinical Experimental Research.* 22(1): 3-9. 1998.
- Kow, LM. y Pfaff, DW. Neuropeptides TRH and cyclo(His-Pro) share neromodulatory, but no stimulatory, action ion hypothalamic neurons in vitro: implication for the regulation of feeding. *Experimental Brain Research* 67(1): 93-99. 1987.

- Kow, LM. y Pfaff, DW. The Effects of the TRH metabolite cyclo (His-Pro) and its analogs in feeding. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 38(2): 359-64. 1991.
- Krahn, D. y Gosnell, BA. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Research* 8: 63-9. 1988.
- Kubek, MJ., Knobloch SM., Sharif, NA., Burt, DR., Buterbaugh, GG y Fuson, KS. Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Annals of Neurology* 33 (1): 70-6. 1993.
- Kupfermann, I. y Schwartz, J. 1995. Motivation. En: Kandell, E., Scharz, J. y Jessell, T. *Essentials of Neural Science and Behavior.* Appleton and Lange, U.S.A., pp. 613-628.
- Kupferman, I. y E. Kandell. 1995. Learning and memory. En: Kandell, E, J. Schwartz y T. Jessell. *Essentials of neural science and behavior.* Appleton and Lange. USA. pp.651-666
- Landsberg, L y Young, J. 1993. Diet and sympathetic nervous system. En: Lehnert,H. y Murison, R. (eds.) *Endocrine and nutritional control of basic biological functions* Hogrefe and Huber publishers.USA pp:3-17.
- Lechan, RM., Molitch, ME. y Jackson, M. Distribution of immunoreactive human growth hormone-like material and thyrotropin-releasing hormone in the rat nervous system: evidence for their coexistence in the same neurons. *Endocrinology* 112: 877-884. 1983.
- Lechan, RM. y Kakuca, I. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Ciba Found. Symp.* 168: 144-58 1992.
- Légradí, G., Emerson, C., Ahima, R., Flier, J. y Lechan R. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus *Endocrinology* 138(6): 2569-2578. 1997.
- Légradí, G. y Lechan, R. The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139(7): 3262-3270. 1998.
- LeDoux. Emotions circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* 23: 155-84. 2000.
- Le Magnen, J. 1992. Neurobiology of feeding and nutrition. Academic Press, Inc., California. pp 147, 295.
- Lee, S-L, Stewart, K., y Goodman, RG. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 263: 16604-16609. 1988.
- Lesage J, Blondeau, B., Grino, M., Breant, B. y Dupouy, JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology.* 142: 1692-1702. 2001.
- Levin, B, Dunn-Meynell, A., y Routh, V. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes *American Journal of Physiology* 276 (45): 1223-1231. 1999.
- Lewis, DE., Shellard, I., Koeslay, DG., Boer, DE., McLarthy, HD., McKibbin, PE, Russell, JC. y Williams, G. Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats. *American Journal of Physiology* 264: 279-84. 1993.
- Low WC., Roepke, J., Farber, SD., Hill, TG., Sattin, A. y Kubek, MJ. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hippocampal formation as determined by radioimmunoassay. *Neuroscience Letters* 103(3): 314-319. 1989.
- Lowry O., Rosebrough, N., Lewis, F. y Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275. 1951.
- Loyd, RL., Pekary, AE., Sattin, A. y Amundson, T. Antidepressant effects of thyrotropin-releasing hormone analogues using a rodent model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 70 (1): 15-22. 2001.
- Lu, X-Y., Barsh, G., Akil, H., y Watson, S. Interaction between α -melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *Journal of Neurosciences* 23(21): 7863-7872. 2003.

- Maes, M., Vandewoude, M., Schotte, C., Martin, M. y Blockx, P. Suppressive effects of dexametason on hypothalamic-pituitary-thyroid axis function in depressed patients. *Journal of Affective Disorders* 20(1): 55-61. 1990.
- Manaker, S., Winokur, A., Rostene, WH. y Rainbow, TC. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *Journal of Neuroscience* 5: 167-174. 1985.
- Mendez, M., Joshep-Bravo, P., Cisneros M., Vargas, M. y Charli, J.L. Regional distribution of *in vitro* release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8: 291-298. 1987.
- Mihály, E., Fekete, C., Tatro, J., Liposits, Z., Stopa, E. y Lechan, R. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(7): 2596-2603. 2000.
- Miyai, K., Yamamoto, T., Azukizawa M., Ishibashi, K. y Kumuhara, Y. Serum thyroid hormones and thyrotropin in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 40 (2): 334-338. 1975.
- Miyamoto, M., y Nagawa, Y Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *European Journal of Pharmacology* 44(2): 143-52. 1977.
- Morimoto, K., Moriwake, T., Sato, T. y Otsuki, S. Anticonvulsant effects of novel TRH analog (DN1417) on amygdaloid kindled seizure. *Kurume Med. Journal* 1983.
- Mountjoy, K., Mortrud, MT. y Low, MJ. Localization of melnocortin-4 receptor and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology* 8: 1298-1308. 1994.
- Mori, M., Yamaguchi, M., Yamada, M., Kobayashi, S., Ishikawa, K. y Suzuki, M. Brain temperature in the rat midbrain reticular formation is regulated by bombesin and TRH. *Endocrinology* 119: 1884-1866. 1986.
- Morzorati, S. y Kubek, MJ. The effect of TRH on ethanol-induced sedation in alcogol-preferring and nonpreferring rats. *Neuropeptides* 25 (5): 283-7. 1993.
- Morris, J. y Dolan, R. Involvement of human amygdala and orbitofrontal cortex in hunger-enhanced memory for food stimuli. *Journal of Neuroscience* 21 (14): 5304-5310. 2001.
- Morris, M., Li, P., Callahan, M., Oliverio, M., Coffman, T., Bosch, S. y Diz, D. Neuroendocrine effects of dehydration in mice lacking the angiotensin AT1a receptor. *Hypertension* 33(2): 482-486. 1999.
- Muñoz, M., y Argente, J. Anorexia nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *European Journal of Endocrinology* 147: 257-286. 2002.
- Musselman, DL. y Nemeroff, CB. Depression and endocrine disorders: focus on the thyroid and adrenal system. *British Journal Psychiatry Supplement* 30: 123-8. 1996.
- Nestler, EJ., Barrot, M., DiLeone, RJ., Eisch, AJ., Gold, SJ. y Monteggia, LM. Neurobiology of depression *Neuron* 34(1): 13-25. 2002.
- Nicolas, J., Fernández-Sola, J., Fatjó, F., Casamitjana, R., Bataller, E., Sacanella, E., Tobías, E., Badía, E. y Estruch, R. Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. *Alcohol Clinical Experimental Research* 25(1): 83-88. 2001.
- Nikodemova, M., Benicky, J., Brtko, J. y Strbak, V. Cronic ethanol drinking and food deprivation affect rat hypothalamic-pituitary-thyroid axis and TRH in septum. *Endocrine* 9(2): 213-8. 1998.
- Nilni, E., Sevarino, K. y Jackson, I. Identification of the Thyrotropin-releasing hormone-prohormone and its posttranslational processing in a transfected AtT20 tumoral cell line. *Endocrinology* 132: 1260-1270. 1993.
- Nilni, E. y Sevarino, K. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine Reviews* 20(5): 599-648. 1999.
- Nilni, E, Vaslet, C., Harris, M., Hollenberg, A., Bjorbaek, C. y Flier, J. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis *Journal of Biological Chemistry* 275(46): 36124-36133. 2000.

- Nishijo, H., Ono, T., Uwano, T., Kondoh, T. y Torii, K. Hypothalamic and amygdalar neural responses to various tastant solutions during ingestive behavior in rats. *Journal of Nutrition* 130: 954-959. 2000.
- Nozaki, T., Tamai, H., Matsubayashi, S., Komaki, G., Kobayashi, N. y Nakagawa, T. Insulin response to intravenous glucose in patients with anorexia nervosa showing low insulin response to oral glucose. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79: 217-222. 1994.
- Obradovic, T. y Meadows, G. Chronic ethanol compsumption increases plasma leptin levels and alters leptin receptors in the hypothalamus and the perigonadal fat of C57BL/6 mice. *Alcohol Clinical Experimental Research* 26(2): 255-263. 2002.
- O'Connor, B. y O'Cuinn, G. Localization of a narrow specificity thyroliberin-hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in a synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *European Journal of Biochemistry* 150: 47-52. 1984.
- O'Connor, T.M., O'Halloran, y Shanahan, F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: form molecule to melancholia. *Quarterly Journal of Medicine* 93: 323-333. 2000.
- O'Dowd, B., Lee, D., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., Gershengorn, M. y George, S. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology* 14: 183-193. 2000.
- O'Doherty, J., Rolls, E., Francis, S., Bowtell, R. y McGlone, F. Representation of pleasant and aversive taste in the human brain. *Journal of Neurophysiology* 85: 1315-1321. 2001.
- O'Leary, R. y O'Connor, B. Thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Neurochemistry* 65(3): 953-963. 1995.
- Ogilvie, K.M. y Rivier, C. Gender difference in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to alcohol in the rat: activational role of gonadal steroids. *Brain Research* 22(766): 19-28. 1997.
- Ono, T., Nishijo, H. y Uwano, T. Amygdala role in conditioned associative learning. *Progress in Neurobiology* 46(4): 401-22. 1995.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Oliveira, K., Soares, B. y Pazos-Moura, C. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. *Journal of Endocrinology* 174: 121-125. 2002.
- Ostlund, R., Yang, J., Klein, S. y Gingerich, R. Relation between plasma leptin concentrartion and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(11): 3909-3913. 1996.
- Otake, K. y Nakamura, Y. Possible pathways through wich neurons of the shell of the nucleus accumbens inglucne the outflow of the core of the nucleus accumbens. *Brain Development* 22(1): 17-26. 2000.
- Palkovits, M. y Brownstein, M. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier. New York. 1988.
- Pannacciulli, N., Vettor, R., Mila, G., Granzotto, M., Catucci, A., Federspil, G., de Giacomo, P., Giorgino, R. y de Pergola, G. Anorexia nervosa is characterized by increasing adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 1748-1752. 2003
- Patton, G., Selzer, R., Coffey, C., Carlin, J. y Wolfe, R. Onset of adolescent eating disorders: population based cohort study over 3 years. *British Mediacal Journal* 318: 765-768. 1999.
- Piano, M., Artwohl, J., Dixon, S., y Gass, G. The effects of a liquid ethanol diet on nutritional status and fluid balance in the rat. *Alcohol and alcoholism* 6(4): 298-303. 2001.
- Pirke, K. y Phillip, E. 1993. Gastrointestinal peptide and amino acids in anorexia nervosa and biulimia nervosa. En: Lehnert, Marison y Weiner. Endocrine and nutritional control of basis biological functions. Hogrefe and Huber, U.S.A., pp. 119-124.
- Raptis, S., Feteke, C., Sarkar, S., Rand, W.M., Emerson, C.H., Nagy, G.M. y Lechan, R.M. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript co-contained in thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates TRH-induced prolactin secretion. *Endocrinology* 145(4): 1695-1699. 2004.

- Riehl, J., Honda, K., Kwan, M., Mignot, E. y Nishino, S. Chronic oral administration of CG-3703, a thyrotropin releasing hormone analog, increases wake and decreases cataplexy in canine narcolepsy. *Neuropsychopharmacology* 23(1): 34-45. 2000.
- Rolls, E. The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral Cortex* 10: 284-294. 2000.
- Rolls, E. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain and Cognition* 55(1): 11-29. 2004a.
- Rolls, E. Convergence of sensory systems in the orbitofrontal cortex in primates and brain design for emotion. *Anatomical Record Part.A. Discoveries Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 281(1): 1212-25. 2004b.
- Rondell, J., Heide, R., de Greef, W., van Toor, H., van Haasteren, G., Klootwijk, W. y Visser, T. Effects of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 56: 348-353. 1992.
- Rosenblum, K., Meiri y Dudai, Y. Taste memory: The role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral and Neural Biology* 59(1): 49-56. 1993.
- Rosenblum, K., Schul, R., Meiri, N., Hadari, Y., Zick, Y. y Dudai, Y. Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proceedings Natural Academy Sciences* 92: 1157-1161. 1995.
- Rubinow, DR, Schmidt, PJ., y Roca, CA. Estrogen-serotonin interactions: implications for affective regulation. *Biological Psychiatrist* 44: 839-50. 1998
- Rupprecht, R., Rupprecht, C., Noder, M. y Mahlstedt, J. Triiodothyronine, thyroxine, and TSH response to dexametasona in depressed patients and normal controls. *Biol. Psychiatry.* 25(1): 22-32. 1989.
- Sanchez, V., Goldstein, J., Stuart, R., Hovanesian, V., Huo, L., Mundzberg, H., Friedman, T., Bejorbaek, C. y Nillni, E. Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of prothyrotropin-releasing hormone. *Journal of Clinical Investigation* 114(3): 357-369. 2004.
- Sattin, A., Pekary, AE. y Lloyd, RL. TRH gene products are implicated in the depressant mechanism of seizures. *Annals of the New York Academy of Sciences* 739: 135-53. 1994
- Sattin, A., Pekary, AE. y Lloyd, RL. TRH in therapeutic vs. nontherapeutic seizures: affective and motor functions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 62(3): 575-83. 1999
- Schwartz, M., Baskin, D., Kaiyala, K. y Woods, S. Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *American Journal of Clinical Nutrition* 69: 584-96. 1999.
- Schwartz, M., Woods, S., Porter, D., Seeley, R. y Baskin, D. Central nervous system of food intake. *Nature.* 404: 661-671. 2000.
- Sebaai, N., Lesage, J., Vieau, D., Alaoui, A., Dupouy, J.P. y Deloof, S. Altered control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. *Neuroendocrinology* 76(4): 243-253. 2002.
- Seeger, G., Braus, D., Ruf, M., Goldberger, U. y Schmidt, M. Body image distortion reveals amygdala activation in patients with anorexia nervosa a functional magnetic resonance imaging study. *Neuroscience Letters* 326: 25-29. 2002.
- Segerson, TP., Kauer, J., Wolfe, HC., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, IM. Y Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus. *Science* 238(4823): 78-80. 1987.
- Seoane, LM., Carro, E., Tovar, S., Casanueva, FF. y Dieguez, C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regulatory Peptides* 92: 25-9. 2000.
- Shambaugh, G., Kubek, M. y Wilber, JF. Thyrotropin-releasing hormone activity in the human placenta. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 48: 483-486. 1979.
- Sharif, NA. y Burt, DR. Limbic, hypothalamic, cortical and spinal regions are enriched in receptors for thyrotropin-releasing hormone: evidence from (3H)ultrofilim autoradiography and correlation with central effects of the tripeptide in rat brain. *Neuroscience letters.* 960(3): 337-42. 1985.

- Sharp, T., Bennett, GW., Marsden, CA. y Tulloch, IF. A comparison of the locomotor effects induced by centrally injected TRH and TRH analogues. *Regulatory Peptides* 9(4): 305-15. 1984.
- Siegfried, Z., Berry, EM., Hao, S. y Avraham, Y. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiology and Behavior* 79(1): 39-45. 2003.
- Smiarowska, M. Leptin and its potential role in the pathomechanism of some hormonal and metabolic disorders of patients with anorexia nervosa. *Annals Academie Medicae Stetinensis* 48: 351-65. 2002.
- Smith, A. y Funder, JW. POMC processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr. Rev.* 9: 159-179. 1988.
- Spear, L. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 24: 417-463. 2000.
- Steinhausen, HS. The outcome of anorexia nervosa in the 20th century. *American Journal of Psychiatry* 159: 1284-2193. 2002.
- Steward, O. 2000. Functional neuroscience. Springer-Verlag. New York. pp 466-482.
- Strand, F. 1999. Neuropeptides. Regulators of physiological processes. The MIT Press. London.
- Strbák, V., Benický, J., Macho, L., Jezová, D. Y Nikodemova, M. Four-week ethanol intake decreases food intake and body weight but does not affect plasma leptin, corticosterone, and insulin levels in pubertal rats. *Metabolism* 47(10): 1269-1273. 1998.
- Strupp, BJ. y Levitsky, DA. Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *Nutrition* 125(8): 2221-2232. 1995.
- Suzuki, S., Solberg, L., Redei, E. y Handa, R. Prepro-thyrotropin releasing hormone 178-199 immunoreactivity is altered in the hypothalamus of the Wistar-Kyoto strain rat. *Brain Research* 913: 224-233. 2001.
- Tache, Y., Stephens, R. y Ishikawa, T. Central nervous system action of TRH to influence gastrointestinal function and ulceration. *Annals of the New York academy of Sciences* 553(1): 269-285. 1989.
- Taylor, WL. y Dixon, JE. Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Biological Chemistry* 253: 6934-6940. 1978.
- Thompson, BL. y Rosen, JB. Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides* 34(1): 38-44. 2000.
- Toro, J. Anorexia nervosa, actividad física y sistema opioide. *Revista de la Asociación para el Estudio de los Trastornos de la Conducta Alimentaria* 1 (3):1-2. 1998.
- Tracy, A., Jarrard, L y Davidson, TL. The hipocampus and motivation revisited: appetite and activity. *Behavioral Brain and Research* 127: 13-23. 2001.
- Treasure, J. 2003 Etiología de los trastornos de la alimentación: factores biológicos. En Rojo, L., Cava, G. Anorexia nerviosa. Ariel, España, pp. 50-68.
- Ueta, Y., Ozaki, Y., Saito, J. y Onaka, T. Involvement of novel feeding-related péptides in neuroendocrine response to stress. *Experimental Biology and Medicine* 228: 1168-1174. 2003.
- Unger, JW., Livingston, JN. y Moss, AM. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signaling mechanisms and functional aspects. *Progress in Neurobiology* 36: 343-62. 1991.
- Uribe, RM, Redondo, J., Charli, J. y Jhoseph-Bravo, P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58: 140-145. 1993.
- Uwano, T., Nishijo, H., Ono, T. y Tamura, R. Neuronal responsiveness to various sensory stimuli and associative learning in the rat amygdala. *Neuroscience* 68(2): 339-61. 1995.

Van Haasteren, G., Linkels, E., van Toor, H., Klootwijk, W., Kaptein, E., de Jong, F., Reymond, M., Visser, T y de Greef, W. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *Journal of Endocrinology* 150: 169-178. 1996.

Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli JL y Joseph-Bravo P. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Brain Research. Developmental Brain Research* 66(2): 251-6. 1992.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana, R. y Chattarji, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience* 22(15): 6810-6818. 2002.

Vaz, F. 2003 Personalidad y anorexia nerviosa. En Rojo, L. y Cava, G. *Anorexia nerviosa*. Ariel, España, pp. 93-109.

Wagner, A., Ruf, M., Braus, DF. y Schmidt, MH Neuronal activity changes and body image distortion anorexia nervosa. *Neuroreport* 14(17): 2193-7. 2003.

Walsh, H., Katz, JL., Levin, J., Kream, J., Fukushima, DK., Hellman, LD., Weioner, H. y Zumoff, B. Adrenal activity in anorexia nervosa. *Psychosomatic Medicine* 40(6): 499-506. 1978.

Watts, A., Sanchez-Watts, G. y Kelly, A. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *Journal of Neuroscience* 19(14): 6111-6121. 1999.

Williams, G., Bing, C., Cai, X., Harrold, J., King, P. y Liu, X. The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits and different purposes. *Physiology and Behavior* 74: 683-701. 2001.

Wolley, C., Gould, E. y McEwen, B. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research* 531: 225-231. 1990.

Woods, S. y Stricker, E. 1999 Food intake and metabolism. En : Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J. y Squire, L. *Fundamental neuroscience*. Academic press, U.S.A., pp. 1091-1109.

Wotus, C., Osborn, JW., Nieto, PA. y Engeland, WC Regulation of corticotrone production by vasopressin during water restriction and after drinking in rats. *Neuroendocrinology* 78(6): 301-11. 2003.

Yamamura, M., Kinoshita, K., Nakagawa, H. y Ishida, R Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog (II): involvement of the DA system in the locomotor stimulating action of TA-0910. *Japanese Journal of Pharmacology* 55(1): 57-68. 1991.

Yang, H., Kawakubo, K, Wong, H., Ohning, G., Walsh, J. y Taché, Y. Peripheral PPY inhibits intracisternal TRH-induced gastric acid secretion by acting in the brain. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (3): 575-521. 2000.

Zigman, J. y Elmquist, J. Minireview: from anorexia to obesity-the Yin and Yang of body weight control. *Endocrinology* 144 (9): 3749-3756. 2003.

Zoeller, R., Kabeer, N. y Albers, H. Cold exposure elevates cellular levels of mRNA encoding TRH in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* 127: 2955-2962. 1990.

Zoeller, R., Fletcher, D., Simonnyi, A. y Rudeen, K. Chronic ethanol treatment reduces the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis to central stimulation. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 20(5): 954-960. 1996.

10. Anexo.

Buffer RIA TRH:

1. 14.377g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow$ anhidro
3.277g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \rightarrow$ monohidratado
la concentración de la solución es 500 mM; ajustar pH a 7.4
2. Llevar la solución anterior hasta 50ml; 10ml/90ml H_2O

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Van Haasteren, G., Linkels, E., van Toor, H., Klootwijk, W., Kaptein, E., de Jong, F., Reymond, M., Visser, T y de Greef, W. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *Journal of Endocrinology* 150: 169-178. 1996.

Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli JL y Joseph-Bravo P. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Brain Research. Developmental Brain Research* 66(2): 251-6. 1992.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana, R. y Chattarji, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *The Journal of Neuroscience* 22(15): 6810-6818. 2002.

Vaz, F. 2003 Personalidad y anorexia nerviosa. En Rojo, L. y Cava, G. *Anorexia nerviosa*. Ariel, España, pp. 93-109.

Wagner, A., Ruf, M., Braus, DF. y Schmidt, MH Neuronal activity changes and body image distortion anorexia nervosa. *Neuroreport* 14(17): 2193-7. 2003.

Walsh, H., Katz, JL., Levin, J., Kream, J., Fukushima, DK., Hellman, LD., Weioner, H. y Zumoff, B. Adrenal activity in anorexia nervosa. *Psychosomatic Medicine* 40(6): 499-506. 1978.

Watts, A., Sanchez-Watts, G. y Kelly, A. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *Journal of Neuroscience* 19(14): 6111-6121. 1999.

Williams, G., Bing, C., Cai, X., Harrold, J., King, P. y Liu, X. The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits and different purposes. *Physiology and Behavior* 74: 683-701. 2001.

Wolley, C., Gould, E. y McEwen, B. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Research* 531: 225-231. 1990.

Woods, S. y Stricker, E. 1999 Food intake and metabolism. En : Zigmond, M., Bloom, F., Landis, S., Roberts, J. y Squire, L. *Fundamental neuroscience*. Academic press, U.S.A., pp. 1091-1109.

Wotus, C., Osborn, JW., Nieto, PA. y Engeland, WC Regulation of corticotrone production by vasopressin during water restriction and after drinking in rats. *Neuroendocrinology* 78(6): 301-11. 2003.

Yamamura, M., Kinoshita, K., Nakagawa, H. y Ishida, R Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog (II): involvement of the DA system in the locomotor stimulating action of TA-0910. *Japanese Journal of Pharmacology* 55(1): 57-68. 1991.

Yang, H., Kawakubo, K, Wong, H., Ohning, G., Walsh, J. y Taché, Y. Peripheral PPY inhibits intracisternal TRH-induced gastric acid secretion by acting in the brain. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 279 (3): 575-521. 2000.

Zigman, J. y Elmquist, J. Minireview: from anorexia to obesity-the Yin and Yang of body weight control. *Endocrinology* 144 (9): 3749-3756. 2003.

Zoeller, R., Kabeer, N. y Albers, H. Cold exposure elevates cellular levels of mRNA encoding TRH in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* 127: 2955-2962. 1990.

Zoeller, R., Fletcher, D., Simonnyi, A. y Rudeen, K. Chronic ethanol treatment reduces the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis to central stimulation. *Alcoholism Clinical and Experimental Research* 20(5): 954-960. 1996.

10. Anexo.

Buffer RIA TRH:

1. 14.377g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow$ anhidro
3.277g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \rightarrow$ monohidratado
la concentración de la solución es 500 mM; ajustar pH a 7.4
2. Llevar la solución anterior hasta 50mM; 10ml/90ml H_2O

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Agregar albúmina de suero bovino (BSA) grado RIA al 0.25% y 150 mM de NaCl para un total de: 50mM de buffer a pH 7.4 + BSA 0.25% + 150mM NaCl

Buffer Fosfatos 50mM, pH 7.4 (también para ensayo fluorométrico):

1. 0.7g de Na_2HPO_4 → dibásico
0.3g de NaH_2PO_4 → monobásico
2. tomar 25ml de monobásico + 100ml de dibásico; pH 7.4

Buffer RIA TSH con EDTA:

2. preparar buffer de fosfatos 50 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.25% BSA
3. añadir

Buffer PBS 50mM, pH 7.5 y 150 mM NaCl

1. 14.377g de Na_2HPO_4 → anhidro
3.277g de NaH_2PO_4 → monohidratado
la concentración de la solución es 500 mM; ajustar pH a 7.4
2. Llevar la solución anterior hasta 50mM; 10ml/90ml H_2O
3. Agregar 150 mM de NaCl

Polietilenglicol al 4%:

0.04g de PEG/1ml buffer PBS

Lowry.

Soluciones.

- *NaOH 0.5 N* (Alyt)
- *Sol. 1*: 2.0 g de Na_2CO_3 , 100 ml al 2% (Sigma)
- *Sol. 2*: 0.2g de tartrato de sodio y potasio, 10 ml al 2% (Fermont)
- *Sol. 3*: 0.1 g de CuSO_4 , 10 ml al 1% (Sigma)
- Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma), dilución con agua destilada 1:1.
- *Sol. E*: 98ml de sol. 1 +
1 ml de sol. 2 +
1 ml de sol. 3 = para 100 ml

Ensayo colorimétrico.

- Sulfamato de amonio (Sigma) al 0.5% en H_2O
- N-naftiletildiamida (N-NEDA) al 0.05% en ETOH al 95%
- Nitrito de sodio. NaNO_2 (Sigma) al 0.1% en H_2O
- Acido tricloroacético al 10% (Sigma)
- β -naftilamida 3.63mg en 380 μl de dimetilsulfoxido (DMSO) para tener una concentración de 1nanomol/ μl de βNA
⇒ tomar 3.75 μl ⇒ completar a 1 ml con buffer ⇒ hacer curva estándar