

EFFECTO DE LA INYECCIÓN DE
ANTAGONISTA DE CRH-R2 EN EL NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO
SOBRE LA EXPRESIÓN DE proTRH EN
RATAS CON ESTRÉS POR
DESHIDRATACIÓN

Karen Fabiola Mancera Alarcón
Facultad de Ciencias, Biología, UNAM

Tutor: Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e .

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

“Efecto de la inyección de antagonista de CRH-R2 en el núcleo paraventricular del hipotálamo sobre la expresión de proTHR en ratas con estrés por deshidratación”

realizado por **Mancera Alarcón Karen Fabiola**, con número de cuenta **401047903**, quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Propietario Dra. Lucia Alba Martínez Mota

Tutor(a)
Propietario Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo

Suplente Dra. Carolina López Rubalcava

Suplente M. en C. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Univeritaria, D. F., a 19 de abril del 2007
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente, en la División de Neurociencias de esta institución, bajo la dirección de la Dra. Patricia de Gortari Gallardo, Investigador en Ciencias "D". Para la realización de esta tesis gocé de una beca de licenciatura otorgada por el Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología, CONACYT, proporcionada a través del proyecto No. (45131-Q), "Participación de la hormona liberadora de la tirotrópina en el efecto del estrés por deshidratación: un modelo de anorexia".

Este trabajo contó con el apoyo del Biol. Adrian Martínez, investigador del Instituto Nacional de Psiquiatría, en la realización de las cirugías descritas en los procedimientos. También se contó con el apoyo de la tecnico Isabel Amaya, para la realización de los procedimientos concernientes a la extracción de RNAm y la preparación de PCRs.

Finalmente se agradece a los sinodales de esta tesis por la revisión y los comentarios realizados con el fin de mejorar este trabajo.

El comité calificador estuvo integrado por:

Tutor (propietario): Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo.

Propietario: Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo.

Propietario: Dra. Lucia Alba Martínez Mota.

Suplente: M. en C. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy.

Suplente: Dra. Carolina López Rubalcava.

INDICE	pags.
1.0 RESUMEN	5
2.0 INTRODUCCIÓN	6-25
2.1.1 Anorexia.	
2.1.2 Características fisiológicas de la anorexia.	
2.1.3 Elementos neurológicos del desarrollo asociados a la anorexia.	
2.1.4 Anorexia y padecimientos psiquiátricos relacionados.	
2.1.5 Sustratos neuronales: Hipotálamo.	
2.1.6 Papel neuroendócrino del PVN	
2.2.1 El eje Hipotalamo- Hipófisis- Adrenal (HHA)	
2.2.2 Elementos involucrados en la transmisión CRHérgica.	
2.2.3 Participación de CRH en la conducta alimentaria.	
2.2.4 Relación de CRH y el hipotálamo lateral (HL).	
2.2.5 CRH en el estrés por deshidratación.	
2.3.1 Características generales de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH).	
2.3.2 Descripción de su papel como neurohormona y regulador del eje Hipotálamo- Hipófisis- Tiroides (HHT).	
2.3.3 Participación de TRH en la conducta alimentaria.	
2.4.1 Modelos de anorexia: estrés por deshidratación	
2.4.2 TRH en el estrés por deshidratación.	
3.0 JUSTIFICACIÓN	25-26
4.0 OBJETIVOS	26-27
5.0 HIPÓTESIS	27
6.0 METODOLOGÍA	28-37
7.0 RESULTADOS	37-70
7.1 Cinética de cambios durante 7 días de estrés por deshidratación en hembras.	
7.2 Cinética de cambios durante 7 días de estrés por deshidratación en machos.	
7.3 Comparación entre géneros	
7.4 Inyección del antagonista Antisauvagina -30 en el NPV	
8.0 DISCUSIÓN	71-81
8.1.1 Cinética de cambios en el peso y consumo de alimentos en hembras y machos durante 7 días de estrés por deshidratación.	
8.1.2 Cinética de cambios en el eje HHT en hembras y machos durante 7 días de estrés por deshidratación.	
8.1.3 Cinética de cambios en el eje HHA en hembras y machos durante 7 días de estrés por deshidratación.	
8.2.1 Inyección del antagonista Antisauvagina -30 en el NPV.	
8.2.2 Cambios en el peso y consumo de alimentos después de la inyección del antagonista antisauvagina-30 en el NPV.	
8.2.3 Efectos específicos de la inyección de Antisauvagina- 30 en el NPV	
8.2.4 Cambios en el eje HHA provocados por la inyección de antisauvagina-30 en el NPV	
8.2.5 Cambios en el eje HHT provocados por la inyección de antisauvagina-30 en el NPV	
9.0 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	82-83
10.0 BIBLIOGRAFÍA	84-113
11.0 ANEXOS	114-116

1.0 RESUMEN

La anorexia es un trastorno alimenticio de creciente importancia en nuestro país. Un modelo animal de anorexia es el estrés por deshidratación (AX), que consiste en la ingesta de solución salina al 2.5% lo que ocasiona pérdida de peso y disminución paulatina de la ingesta de alimento. Algunas de las adaptaciones metabólicas que resultan son semejantes a las de la restricción alimentaria (RA): el incremento de la expresión de NPY, proopiomelanocortina y neurotensina en el núcleo arcuato y en suero, el aumento de contenido de glucocorticoides, así como la disminución de leptina e insulina. Entre las diferencias, se encuentran la falta de adaptación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) característico del ayuno y RA, dándose en su lugar un aumento de la expresión de proTRH del núcleo paraventricular de hipotálamo (NPV) así como el incremento de CRH en el hipotálamo lateral (HL) de ratas sometidas al modelo de AX. La expresión de CRH-R2 (que esta involucrado en los efectos de CRH sobre el consumo de alimentos), en el NPV, disminuye solo en la AX después de 7 días, lo que sugiere que se encuentra activado por la liberación de CRH. Éste CRH podría provenir de las neuronas CRH-érgicas del HL que proyectan hacia el NPV.

A pesar de que se conocen los cambios que provoca el estrés por deshidratación al final de 7 días, se desconoce su cinética lo cual podría resultar útil en la creación de modelos experimentales (estableciendo días de tratamiento, géneros, etc), tales como el bloqueo de receptores a través del uso de antagonistas de los posibles efectores. El objetivo de este trabajo es probar la participación del CRH-R2 del NPV en el modelo de estrés por deshidratación. Para ello se establecieron primero las variables que serían utilizadas para el bloqueo de los receptores CRH-R2 del NPV. Ratas Wistar hembras y machos fueron divididas en 3 grupos (AX, RA y control) y sacrificadas en los días 3,5 y 7 con el fin de observar la cinética de cambios del eje HHT y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Los resultados de la cinética mostraron que aunque ambos géneros tienen la capacidad de activar el eje HHT bajo estrés por deshidratación, los machos presentaron una mayor expresión de proTRH con respecto a su control en comparación con las hembras, lo que supone que éstos tienen una mayor capacidad para activar el eje HHT bajo estrés por deshidratación. Los cambios observados en el eje HHT fueron similares en ambos géneros al día 7. Los cambios en la activación del eje HHA fueron similares entre los grupos AX y RA, lo que indica que las variaciones de este eje son debidas al déficit alimentario. Estos resultados permitieron establecer la metodología del segundo experimento, en el cual, ratas Wistar macho (n = 12) se implantaron con cánulas en el NPV (AP= -1.08; L= 0.2; V= 7.2) y se inyectaron con 3 dosis de Antisauvagina-30 (15,30 y 60 nmol) diariamente por 7 días. Como en el primer experimento, se midió diariamente el consumo de agua y alimento. Los animales se decapitaron, se extrajeron cerebros para medir contenido de RNAM, por RT-PCR, de proTRH y CRH-R2 en el NPV y en adenohipófisis los de TRH-R1 y PPII (enzima inactivante de TRH); en suero se midieron hormonas tiroideas, corticosterona y TSH por RIA. Se analizaron los datos con una ANOVA de una vía, definiendo como cambios significativos cuando $p < 0.05$. La inyección del antagonista de los receptores de CRH-R2, antisauvagina-30 a la dosis media (30 nmol/día), si bien no revirtió su consumo de alimento a valores normales, si incrementó la ingesta comparado al control inyectado con solución. La antisauvagina revirtió la activación del eje HHT provocada por el estrés por deshidratación: los valores de proTRH, TSH y T4 se normalizaron a los niveles de los controles intactos. Además, disminuyó la expresión de los receptores CRH-R2 del NPV, lo que apoya la participación de este receptor en la regulación de la expresión de proTRH. Esta misma dosis no afectó en cambio la activación del eje HHA confirmando lo reportado en la literatura que sugiere que el receptor CRH-R2 no participa en la regulación de este eje. Estos resultados apoyan la participación de los receptores CRH-R2 del NPV en la activación del eje HHT inducida por el estrés por deshidratación.

2.0 INTRODUCCIÓN

La expresión del apetito o el impulso de búsqueda hacia una fuente de energía es un fenómeno altamente regulado en vertebrados y es además considerada una conducta clave para la mantenimiento de la homeostasis energética y la regulación del peso corporal (Satya y cols., 1999; Schwartz, 2001).

Se ha propuesto al hipotálamo como la parte del sistema nervioso central (SNC) encargada de la homeostasis energética ya que integra las señales periféricas generadas en respuesta al consumo de alimentos (intrínsecas), las exteriores que resultan de la presencia de comida (olor, aspecto), así como las provocadas por hábitos y/o comportamientos sociales. La sensación de saciedad es producida por señales generadas en el organismo en respuesta al consumo de alimento (Gale, Castracane y Mantzoros, 2003). La alteración de la interconexión de estas señales es lo que da lugar a lo que se conoce como desórdenes alimentarios, entre los que destacan la obesidad, la bulimia (inducción del vómito después de la ingesta de alimento) y la anorexia nervosa (ausencia de la ingesta de alimento).

2.1.1 Anorexia.

La anorexia nervosa es un trastorno alimentario que se compone de factores emocionales, genéticos, biológicos y culturales. Entre sus características se encuentran la disminución voluntaria de la ingesta de alimento, el rechazo a mantener un peso corporal normal, alteración de la percepción de la imagen corporal y un déficit de energía significativo que puede ser un reflejo de la falta de apetito. Se asocia a múltiples cambios endocrinos y metabólicos muchos de ellos resultado de la desnutrición, por ejemplo, la amenorrea (ausencia de la menstruación). Está asociado a trastornos psiquiátricos (depresión, fobias, ansiedad, trastornos obsesivo-compulsivos, etc.) que contribuyen al mantenimiento de la enfermedad (Beato y cols., 1999; Jonson y cols., 2002; Kaye, 1997; Steinhausen, 2002; Treasure, 2003).

Se calcula que más del 90% de los casos de anorexia nervosa en los países occidentales son mujeres, mientras que la incidencia en hombres es de 1 hombre por cada 20 mujeres (Moral de la Rubia, 2002). En la Ciudad de México se estima una incidencia anual de casos reportados del 0.5-1% en población general. Suele iniciarse en la adolescencia,

entre los 13 y 18 años de edad y sólo en un 5% de los casos se inicia después de los 20 años. Aparece más en clases socioeconómicas alta y media. Un factor de riesgo es la realización de actividades físicas con un alto gasto energético; así, es más frecuente en profesionales del arte como, cantantes, actrices, gimnastas, bailarinas (Gomez, 1993; Unikel y cols., 1996 y 2000).

2.1.2 Características fisiológicas de la anorexia.

La restricción de la ingesta de alimentos produce una serie de cambios de naturaleza metabólica y endocrinas, que son consecuencia directa del déficit de consumo de alimentos (Borrego, 2000; Eckert y cols., 1998). Entre estos cambios destacan: la disminución del tejido adiposo, lo que a su vez disminuye los niveles de leptina sérica (Samiarowska, 2002; Grinspoon y cols., 1996; Ostlund y cols., 1996); la disminución de los niveles séricos de insulina (Seoane y cols., 2000); el aumento en la concentración sérica de corticosterona (Smiarowska, 2000); la baja concentración de las hormonas tiroideas séricas (T3 [triiodotironina] y T4 [tetraiodotironina o tiroxina]) (Croxson e Ibbertson, 1997), entre otros. Algunas de estas anomalías son producto directo del déficit de consumo de alimentos, mientras que otras son características del padecimiento (Støving y cols., 1999).

Existe evidencia que involucra a los transmisores monoaminérgicos en los desórdenes alimenticios. Por ejemplo, la norepinefrina (NE) incrementa el consumo de alimento a través de los receptores α -2 (Goldman y cols., 1985; Leibowitz y cols., 1985). Los pacientes anoréxicos muestran niveles elevados de NE en suero (Van Binsbergen y cols., 1991) pero no en el líquido cerebroespinal ó cerebro-raquídeo (LCR) (Kaye y cols., 1984); una vez recuperados, los niveles de NE en CFS regresan a los niveles del control (Kaye y cols., 1984).

El consumo frecuente o en dosis altas de anfetaminas, que estimulan la liberación de DA, provoca un comportamiento psicótico y anoréxico (Baez, 1974; Klawans y Margolin, 1975) por lo que se ha sugerido que el aumento de la actividad dopaminérgica desempeña una función en la psicopatología de la anorexia (Barry y Klawans, 1976).

La actividad serotoninérgica (5-HT) central reduce el consumo de alimentos (Paez y Leibowitz, 1993; Leibowitz y cols., 1993) específicamente en el hipotálamo medial (Leibowitz y cols., 1990). La concentración de 5-HT es alta (y la de sus precursores, baja)

en el suero de pacientes con anorexia (Hassanyeh y Marshall, 1990; Coopen y cols., 1976) lo que presupone un incremento en la actividad serotoninérgica; sin embargo, las concentraciones del principal metabolito de 5-HT, el 5- hidroxindolacetato (5HIAA), está disminuído en el CSF (Kaye y cols., 1984), lo que sugiere una disminución de la actividad serotoninérgica en la anorexia.

El problema inherente de la interpretación de los datos clínicos en los cuales se evalúa los niveles de metabolitos de neurotransmisores en fluidos como sangre o LCR radica en la dificultad de extrapolarlos a la actividad neuronal en áreas cerebrales específicas ya que mientras una vía serotoninérgica por ejemplo, las aferentes hacia hipotálamo, pudiera estar activadas, otras podrían estar inhibidas (amígdala por ejemplo).

Existen varios péptidos que regulan el apetito cuyo contenido y expresión cambian en la anorexia. El neuropéptido Y (NPY) sintetizado en el núcleo arcuato estimula el apetito con un efecto más específico, prolongado y potente que cualquier otra sustancia (Stanley y cols., 1986). La liberación *in vivo* de NPY en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) aumenta durante el hambre y disminuye durante las comidas (Kalra y cols., 1991). La concentración de NPY está aumentada en el CFS en pacientes con anorexia y se normaliza hasta que los pacientes recuperan peso; en caso de las mujeres, hasta que regresa la menstruación (Kaye y cols., 1990).

La leptina es una hormona sintetizada y secretada por las células grasas en respuesta a los glucocorticoides séricos. Su receptor se expresa en el hipotálamo, que es donde ejerce su mayor control (Considine y cols., 1996). El efecto supresor de la leptina sobre la ingestión de alimentos se debe a su acción inhibitoria de la secreción de NPY y estimuladora de α -MSH (Stephens y cols., 1995; Schwarts y cols., 1996). En los pacientes con anorexia hay un descenso del contenido de leptina en suero y en el CSF (Hebebrant y cols., 1995; Mantzoros y cols., 1997), lo que se interpreta como reflejo del bajo nivel de tejido adiposo.

La hormona liberadora de la corticotropina (CRH) es hipersecretada en los pacientes con anorexia (Walsh y cols., 1987; Gold y cols., 1986). Esta hipersecreción de la eminencia media del hipotálamo se traduce en un aumento en los niveles de cortisol sérico (el glucocorticoide característico de los humanos) (Baranowska, 1990; Vierhapper y cols.,

1990; Kontula y cols., 1982). El efecto estimulante de NPY sobre el apetito es inhibido por CRH (Menzaghi y cols., 1993; McCarthy y cols., 1993) existiendo un equilibrio dinámico entre la actividad de NPY y la de CRH importante para la regulación del consumo de alimentos (Liu y cols., 1994), por lo que se considera que la actividad anormal de CRH durante la anorexia y su interacción con NPY juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Kaye y cols., 1989; Menzaghi y cols., 1993).

La restricción del consumo de alimentos (ayuno, desnutrición, dietas hipocalóricas) cursa con bajas concentraciones séricas de T3, T4 y tirotropina (TSH) bajos (Kiyohara y cols., 1989; Bannai y cols., 1988; Croxson e Ibbertson, 1977; Turkay y cols., 1995). Sin embargo, en la anorexia, las concentraciones de T4 y TSH pueden ser normales o bajas, además de exhibir una característica peculiar, la respuesta de TSH a la administración de hormona liberadora de la tirotropina (TRH) está retrasada (Matsubayashi y cols., 1988; Kiriike y cols., 1987); los niveles bajos de T3 en la anorexia pueden deberse a hiposecreción tiroidea causada por la alteración en la respuesta de TSH (Støving y cols., 1999). En las mujeres la pérdida de peso asociada con la amenorrea se ha visto revertida por inyecciones de TRH, que causa un incremento en las gonadotropinas (Morishita y cols., 1991), lo que apunta a que una secreción debilitada de TRH forma parte de la patogénesis de la amenorrea de origen hipotalámico (Støving y cols., 1999).

2.1.3 Elementos neurológicos del desarrollo asociados a la anorexia.

Existen factores ambientales y del desarrollo de cada individuo que son capaces de disparar cambios en la fisiología que culminan en una alteración prolongada y hasta permanente de ciertos aspectos neuroendócrinos. Estos factores tienen una gran importancia en la aparición de la anorexia. Por ejemplo, pacientes con anorexia tienen antecedentes de madres que sufrieron de complicaciones y ansiedad durante el embarazo (Shoebridge y cols., 2000); los lazos con la madre y el estrés que la falta de éstos produce, es un elemento importante que puede alterar el desarrollo de sistemas neuronales (Connan y cols., 2003). Las crías de las ratas que experimentan niveles óptimos de cuidado parental presentan una actividad muy eficiente del eje hipotálamo-hipófisis- adrenal (HHA), en comparación con las crías que son separadas de las madres (Francis y cols., 1999; Plotsky y cols., 1993). En la adolescencia, las ratas que son separadas de la madre presentan un peso corporal significativamente más bajo que aquellas que experimentaron un cuidado parental completo (Connan y cols., 2003; McIntosh y cols., 1999).

La anorexia, como otras enfermedades psiquiátricas, presenta un componente genético importante. Se calcula que existe un riesgo de 60-90% de desarrollar anorexia cuando el componente genético está presente (Bulik y cols., 2000); A eso contribuyen la adolescencia y el estrés que la caracteriza (Connan y cols., 2003). Por ejemplo, las concentraciones elevadas de estrógeno característicos de la pubertad, estimulan la secreción de CRH a través de un elemento que responde al estrógeno en el promotor del gen de CRH (Torpy y cols., 1997; Cary y cols., 1995) lo que altera la ingesta de alimento al aumentar la expresión de CRH (Connan y cols., 2003). Del mismo modo, en el cerebro tiene lugar durante la adolescencia, procesos de mielinización y sinaptogénesis en regiones límbicas y frontales importantes en la integración emocional y la cognición (Benes, 1998); así, las interrupciones repentinas en el desarrollo cerebral pueden contribuir a los cambios emocionales y cognitivos en aquellos que son propensos a la anorexia (Tehanturia y cols., 2001).

2.1.4 Anorexia y padecimientos psiquiátricos relacionados.

La anorexia nervosa está relacionada con otros desórdenes psiquiátricos. Por ejemplo, en un estudio de comorbilidad, de un grupo de 51 adolescentes con anorexia, 86% presentaron también depresión clínica. Tanto pacientes con depresión como pacientes con anorexia presentan una respuesta retrasada de TSH al TRH administrado exógenamente (Matsubayashi y cols., 1988; Kiriike y cols., 1987; Loosen, 1985). La depresión puede resultar de la restricción alimentaria por la elevación de la concentración de CRH en CFS asociada, y a una baja actividad de la vía de 5-HT (Altemus y Gold, 1992; Cowen y cols., 1992; Kaye y cols., 1984). Sin embargo, a pesar de que la depresión crónica y la anorexia comparten la característica de una hiperactividad del eje HHA, los mecanismos bajo los cuales se da esta hiperactivación varían (Connan y cols., 2003). En el desorden depresivo, pueden existir niveles aumentados de arginina vasopresina (VP) además de una sensibilidad aumentada a ésta (Von Bardeleben y cols., 1989; Rubin y cols., 1999). La VP tiene la capacidad de sustituir a CRH en la activación del eje HHA en estrés crónico (Aguilera y Rabadan, 2000). Sin embargo, los anoréxicos no presentan respuestas aumentadas a VP, a pesar de presentar niveles altos de VP en el CFS (Connan y cols., 2003; Gold y cols., 1983). Esta disfunción en la regulación del eje provoca que el eje se active únicamente a través de la hipersecreción de CRH en anoréxicos (Connan y cols., 2003).

Los pacientes con ansiedad o con anorexia presentan altas concentraciones de CRH en el fluido cerebroespinal (De Souza y Nemeroff, 1990; Støving y cols., 1998). El CRH es un neuropéptido que además de estar presente en el NPV donde regula la actividad del eje HHA, se sintetiza en otras zonas como la amígdala que participan en el circuito de estrés (ref). La inyección central de CRH reproduce la conducta de estrés, miedo o ansiedad que se observa en animales expuestos al estrés o en aquéllos que se estimula eléctricamente la amígdala (Heinrichs y cols., 1994, Imaki y cols., 1993). El CRH causa también anorexia, aumento de la actividad motora y disminución de la actividad sexual (Krahan y cols., 1988; Wiersma y cols., 1995); efectos que son invertidos con la administración de antagonistas de CRH (Krahan y cols., 1986, Heinrichs y cols., 1994).

El desorden obsesivo compulsivo (OCD) y otros desórdenes de ansiedad como el estrés postraumático (PTSD) y las fobias, como la fobia social, también están altamente relacionados con la anorexia (Couturier, 2004). Los desórdenes alimentarios pueden ser una variante del OCD ya que existen similitudes en los perfiles neuroquímicos de pacientes con OCD y pacientes que han experimentado anorexia por largos periodos de tiempo, como son los bajos niveles de 5-HT en líquido cerebroespinal (Kaye y cols., 1991). El conjunto de estas evidencias sugieren que la inhibición de la ingesta de alimento que ocasiona la anorexia puede exacerbar una predisposición genética a la depresión o a desórdenes relacionados con la ansiedad (Couturier, 2004). O bien, la anorexia y otros desórdenes alimentarios son una variante más de desórdenes emocionales neuroendocrinos previas a la aparición de la anorexia (Levy y Dixon, 1985). A pesar de las dudas existentes en cuanto a la comorbilidad de estas enfermedades, las moléculas que intervienen en dichos procesos tienen sustratos neuronales comunes, siendo uno de los más importantes el hipotálamo.

2.1.5 Sustratos neuronales: Hipotálamo.

Como se mencionó, la expresión del apetito está codificada químicamente en el hipotálamo, lo que le confiere un papel fundamental en el control de la homeostasis energética (Kalra y cols., 1996, 1997 y 1999; Wynne y cols., 2005; Leibowitz y Wortley, 2004). Por la naturaleza de sus funciones, está implicado en los trastornos alimenticios y se ha probado que la degeneración progresiva, sobrestimulación o inhibición de los circuitos neuroquímicos del hipotálamo, producida por perturbaciones ambientales, genéticas u hormonales, da lugar a trastornos alimentarios como son la hiperfagia o la anorexia (Kalra, 1999; Jeffrey y cols., 2003).

El hipotálamo cuenta con un circuito neuronal intrincado que regula el apetito y el control del peso corporal a través de la comunicación entre diversos núcleos que lo conforman: el núcleo arcuato (ARC), el núcleo ventromedial (VMH), el núcleo dorsomedial (DMH), el núcleo supraquiasmático (SCN), el núcleo paraventricular (NPV) y el hipotálamo lateral (HL) (de Gortari P y Joseph- Bravo P., 2006, Kalra y cols., 1999). Las neuronas que integran estos circuitos que elaboran, emiten y reciben señales orexigénicas (generadoras de apetito) y anorexigénicas (inhibidoras de apetito).

Señales orexigénicas	Señales anorexigénicas
<ul style="list-style-type: none"> • Neuropéptido Y (NPY) • Galanina (GAL) • Orexinas (A y B) • Péptido relacionado al agouti (AgRP) • Aminoácidos (Glutamato y ácido γ-aminobutírico (GABA)) • Grelina • Péptidos opioides • Hormona concentradora de melanina (MCH) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hormona liberadora de la corticotropina (CRH) • Hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) • Transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) • Péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) • Leptina • Proopiomelanocortina (POMC) • Hormona α estimulante del melanocito (α-MSH) • Serotonina (5-HT) • Insulina • Colecistoquinina (CCK) • Neurotensina • Somatostatina

Señales orexigénicas (estimuladoras de la ingesta) y anorexigénicas (inhibidoras de la ingesta) involucradas en la regulación de la homeostasis energética.

El núcleo arcuato (ARC) está localizado alrededor del tercer ventrículo, en la base del hipotálamo. Sus axones están en contacto directo con el flujo sanguíneo y es capaz de percibir concentraciones hormonales precisas (de Gortari y Jsipeh-Bravo, 2006). El ARC produce péptidos orexigénicos como NPY y el péptido relacionado al agouti (AgRP), así como péptidos anorexigénicos como el transcrito relacionado a cocaína y anfetamina (CART) y la proopiomelanocortina (POMC). Las neuronas del ARC proyectan a otros núcleos del hipotálamo como son: NPV, DMH, VMH y HL. (de Gortari y Joseph- Bravo, 2006; Kalra y cols., 1999).

El núcleo ventromedial (VMH) recibe proyecciones de neuronas del ARC que sintetiza NPY, AgRP, y POMC, y proyecta a su vez a otros núcleos del hipotálamo, como son el DMH o extrahipotalámicas, como las regiones del tallo cerebral que controlan la función del sistema nervioso autónomo (Wynne y cols., 2005). Se ha observado que lesiones bilaterales del VMH producen hiperfagia y obesidad (Brobeck 1946; Anand y cols., 1951; Powel y cols., 1980). Aquí se produce también el neuropéptido NPY, cuya expresión se ve alterada en ratones obesos (Guan y cols., 1998) y además se encuentran receptores de melanocortina 4 (MC4R), cuya expresión aumenta en ratones con obesidad inducida a través de la dieta (Huang y cols., 2003). Además se expresa el factor neurotrópico derivado del cerebro (BDNF), reducido por la restricción alimentaria (Xu y cols., 2003).

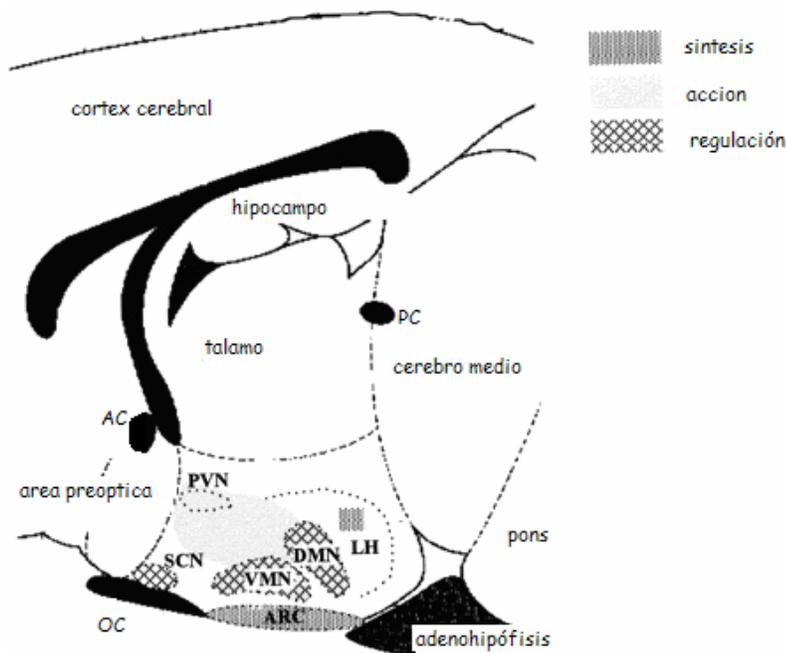
El núcleo dorsomedial (DMH) tiene conexiones extensas con otros núcleos hipotalámicos, incluyendo el ARC de donde recibe proyecciones de AgRP y NPY (Kalra y cols., 1999). La leptina es capaz de inhibir la ingesta de alimentos inducida por el NPY de este núcleo por lo que se interpreta que el sitio de interacción entre estos dos péptidos puede residir en el DMH y que por ende puede representar un componente en el circuito que maneja la inhibición o atenuación de la ingesta de alimentos por leptina (Yokosuka y cols., 1997 y 1998). También se ha observado que la melanocortina puede atenuar la expresión de NPY en este núcleo (Chen y cols., 2004).

El núcleo supraquiasmático (SCN) percibe el ciclo de luz y puede regular la energía almacenada a través de sus conexiones con otros núcleos como el NPV. Regula la ingestión de alimento a ciertas horas del día, a través de la información que proporciona el ciclo luz-oscuridad. Lesiones discretas de este núcleo ocasionan que los animales coman sin un patrón específico (Nagai y cols., 1978; Van den Pol y Powley, 1979).

El núcleo paraventricular (NPV) es el área que recibe e interpreta señales periféricas y centrales que informan al hipotálamo de las condiciones ambientales. En la región magnocelular del NPV se sintetiza y libera VP y OX, mientras que en la zona parvocelular se sintetiza y libera CRH y TRH. El NPV, mediante su función hipofisiotrópica o a través de sus aferentes a núcleos del tallo cerebral, controla la termogénesis de la grasa parda (BAT), así como la tasa respiratoria y ciertos movimientos gastrointestinales (de Gortari, Joseph-Bravo, 2006). Microinyecciones en el NPV, de virtualmente todas las señales orexigénicas conocidas (NPY, galanina, orexinas, GABA, opioides, NE y epinefrina),

estimulan la ingesta de alimento (Morely, 1987; Stanley y cols. 1985, Kyrkouli y cols., 1986 y 1990, Nelly y cols., 1980, 1979, y 1977; Grandison y Guidotti, 1977; Scich y cols., 1993). Adicionalmente, microinyecciones de CRH (Krahan y cols., 1988; Monnikes y cols., 1992) y de leptina (Satoh y cols., 1997) en este núcleo reducen la ingesta de alimento inducida por periodos de restricción alimentaria. Esto implica la existencia de receptores de todas estas sustancias en el NPV y sus vecindades. Esta área se conecta a diferentes núcleos hipotalámicos como son HL, ARC y DMH y proyecta hacia varias regiones cerebrales incluyendo el núcleo paraventricular del tálamo, el núcleo central y medial de la amígdala (Berthoud, 2002).

El hipotálamo lateral (HL) es un componente central en la expresión de eventos conductuales de naturaleza motora. La estimulación química y eléctrica de esta área estimula la ingesta de agua de forma inmediata en animales (Greer, 1995, Grossman, 1960 y 1962; Mogenson y Stevenson, 1966 y 1967; Swanson y Sharpe, 1973). Las lesiones del HL producen afagia temporal y pérdida de peso corporal. (Anand y Brobeck, 1976). La severidad de estos síntomas dependen del tamaño y la localización de la lesión (Bernardis y Bellinger, 1996). Existe evidencia reciente de que el NPY, la hormona concentradora de melanina (MCH), orexinas y el aminoácido excitatorio (EAA) glutamato, sintetizados en el HL; microinyecciones de orexina y agonistas de glutamato estimulan la ingesta de alimento (Kalra y cols., 1999). El HL tiene terminales de NPY, AgRP y de la hormona estimulante del α melanocito (α -MSH) y están en contacto con las neuronas orexigénicas y α -MSH (Broberger y cols., 1998; Elias y cols., 1998; Horvath y cols., 1999) que a su vez, presentan receptores a leptina (Campbell y cols., 2003; Horvath y cols., 1999). Varias señales periféricas son interpretadas por neuronas sensibles a la glucosa (Bernardis y Bellinger, 1996).



Representación diagramático de los sitios del hipotálamo asociados con las señales neuroquímicas que controlan la ingesta de alimento. AC = comisura anterior; PC = comisura posterior. Síntesis = sitios que sintetizan señales orexigénicas y anorexigénicas; Acción = sitios en donde las señales actúan; Regulación = sitios en donde las señales se sintetizan, liberan y actúan. De Kalra y cols., 1999, Endo Rev, 20(1): 68-100.

2.1.6 Papel neuroendocrino del NPV.

Las hormonas tiroideas y adrenales (glucocorticoides) son importantes participantes del control metabólico. Los glucocorticoides regulan el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas, (Pepin y cols., 1992) Los niveles de estas hormonas son regulados por los ejes HHT y HHA respectivamente. Como se discutió anteriormente, el NPV es el área responsable de activar ambos ejes a través de la síntesis tanto de CRH y TRH, por lo que el papel de este núcleo en el control metabólico es de gran importancia. A continuación, se describen más a detalle los mecanismos bajo los cuales el NPV inicia la activación de estos ejes.

2.2.1 Eje Hipotálamo- Hipófisis- Adrenal (HHA).

La parte medial de la región parvicelular del NPV sintetiza CRH, péptido de 41 aminoácidos (Vale y cols., 1981). Las neuronas de esta área envían sus axones hacia la eminencia media de donde liberan el péptido en respuesta a un estímulo, al sistema portal sanguíneo que lo transporta a la adenohipófisis donde induce la síntesis y liberación de ACTH (hormona adenocorticotrópica). La ACTH tiene como órgano blanco la corteza adrenal, donde controla la síntesis y liberación de los glucocorticoides (corticoesterona en

ratas y cortisol humanos) (de Gortari y Joseph- Bravo, 2006). El incremento en los niveles de glucocorticoides inhibe al eje HHA (retroalimentación negativa) inhibiendo la síntesis y liberación de ACTH en la adenohipófisis y de CRH en el hipotálamo (Chrousos y Kino, 2005). y también se ha observado que son capaces de disminuir la expresión del RNAM de TRH en el NPV (Alkemade, 2005), además de que son estos lo que participan en la inhibición

Además del CRH, la vasopresina (VP) estimula la secreción de ACTH en la adenohipofisis (Aguilera y Rabadán- Diehl, 2000). Como ya se mencionó, la secreción de VP aumenta en respuesta a estrés crónico (Ma y Lightman, 1998; Aubry y cols., 1999) y está acompañada de una expresión elevada de receptores de VP en la adenohipófisis, sensibilizando al eje HHA para una activación por la VP (Rabadan y cols., 1995; Hashimoto y cols., 1988). VP inhibe la liberación de CRH a nivel hipotalámico (Plotsky y cols., 1984). En condiciones de estrés crónico hay un cambio de secreción de CRH a VP que permite mantener el eje HHA activado a pesar de altos niveles de glucocorticoides que inhiben la expresión de CRH (Aguilera y Rabadan, 2000). En la anorexia, la actividad de VP no está aumentada a pesar de los niveles elevados de VP en el CFS (Connan y cols., 2003; Gold y cols., 1983) sugiriendo una falla tanto en la secreción como en la sensibilidad de la adenohipófisis a VP, una respuesta anormal de VP al estrés crónico (Connan y cols., 2003; Foppiani y cols., 1996). En la ausencia de actividad aumentada de VP, la hiperactividad del eje HHA en la anorexia debe por ende ser mantenida por niveles elevados y sostenidos de CRH (Connan y cols., 2003).

2.2.2 Elementos involucrados en la transmisión CRHérgica.

El CRH cuenta con dos receptores de 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G: CRH-R1 y CRH-R2. Estos receptores son codificados por genes distintos y han sido clonados en mamíferos, encontrándose también isoformas del receptor 2: CRH-R2 α , CRH-R2 β y CRH-R2 γ (Perrin y Vale, 1999). Se han encontrado otros 3 péptidos relacionados al CRH por su homología a su secuencia generadora y con respecto a sus funciones, llamados Urocortina (Ucn), Urocortina II (UcnII) y Urocortina III (Ucn III) que han sido identificados en humanos y roedores y que han resultado ser más afines a los receptores CRH-R2 y todas sus variantes que el propio CRH, por lo que se considera que las urocortinas son los ligandos endógenos de este receptor (Donalson y col., 1996; Vaughan y cols., 1996; Lewis y cols., 2001; Reyes y cols., 2001). La distribución de las

células que expresan urocortinas se encuentra aún en estudio pero se sabe que varía de aquéllas que expresan CRH y también entre ellas mismas. Hasta el momento se sabe que las células que expresan Ucn se encuentran en el núcleo Edinger- Westphal, la oliva lateral superior, el hipotálamo lateral y el núcleo supraóptico (SON), mientras que las que expresan UcnII se localizan tanto en el área magnocelular como parvicelular del NPV así como en el SON. Finalmente, las células que expresan UcnIII se encuentra principalmente en el área rostral preforínical, entre el fórnix y el NPV, y en una pequeña región del área magnocelular del NPV y extrahipotalámicamente, en la división dorsal del núcleo medial de la amígdala. También hay expresión de RNAm de Ucn en la piel y el corazón (Vaughan y cols., 1995; Spina y cols., 1996; Asuka y Tamotsu 2004).

El receptor CRH-R1 es el más abundante en la adenohipofisis y es el responsable de mediar la acción estimuladora de CRH en la secreción de ACTH. Este receptor también se localiza en áreas corticales del cerebro, cerebelo y sistema límbico (Aguilera y cols., 2004). Por otro lado, el receptor CRH-R2 es ampliamente expresado en la periferia, en sitios como el corazón, el músculo y el tracto gastrointestinal y en el cerebro en sitios como el hipotálamo (VMN y NPV, por ejemplo, el septum lateral y la vasculatura cerebral) (Cone, 2000) .

El CRH del NPV, de los ventrículos laterales cerebrales, del septum y del locus coeruleus puede producir poderosos efectos excitadores en la actividad locomotora y da lugar a efectos relacionados con la ansiedad (Monnikes y cols., 1992; Dunn y cols., 1990; Britton y cols., 1982; Morley y Levine, 1982). Se ha observado que forma parte esencial en la coordinación de respuestas endocrinas, autónomas, inmunes y conductuales que se relacionan con el estrés (Brown y cols., 1990; DeSouza, 1995; Koob y cols., 1993; Takahashi y cols., 1989. se consideraba que el CRH-R1, al ser el nque participa en la regulación del eje HHA, era el que estaba totalmente relacionado con la ansiedad y el estrés, sin embargo, estudios demuestran que los ratones knockout para CRH-R2 muestran hipersensibilidad al estrés con un incremento en los comportamientos relacionados con la ansiedad (Bale y cols., 2000) y que los knockout para CRH-R1 muestran, además una serie de respuestas conductuales relacionadas por estrés, una respuesta retrasada en el eje HHA, dado la falta del desarrollo del área llamada zona fasciculata, generando así una deficiencia de ACTH en el desarrollo (Smith et al., 1998; Timpl et al., 1998).

2.2.3 Participación de CRH en la conducta alimentaria.

Se ha observado que la inyección central de CRH en ratas produce anorexia, como se evidencia por la atenuación de la ingesta nocturna e inducida por restricción de alimento en ratas, y la ingesta en paradigmas diseñados para evaluar la conducta alimentaria (Morley, 1987; Morley y Levine, 1982; Krahan y cols., 1984). Microinyecciones de CRH han revelado que el sitio de acción anorexigénica de CRH se encuentra en el NPV y que este efecto está mediado por alguno de los receptores de CRH (Karla y cols., 1999; Monnikes y cols., 1992; Morley y Levine, 1982; Heinrichs y cols., 1993). Solamente la inyección de CRH en el NPV y no en otro lugar inhibe la ingesta de alimentos inducida por NPY (Henrischs y cols., 1993).

Por otro lado, la controversia sobre que receptor media los efectos anorexigénicos de CRH en el NPV se ha disipado ya que, estudios con ratones knock out para CRH-R1 no presentan defectos en la conducta alimentaria, mientras que los ratones knock out para CRH-R2 la presentan alterada después de un periodo de 24 horas de restricción alimentaria (Bale y cols., 2000). Por otro lado, se ha observado que Ucn tiene un efecto mayor que CRH en la disminución de la ingesta de alimento después de periodos de restricción o en la ingesta nocturna (Vaughan y cols., 1995; Spina y cols., 1996) lo que implica que son los receptores CRH-R2 los que median el efecto anorexigénico de CRH.

Finalmente, el elemento que aclara la participación de CRH-R2 como mediador de la anorexia provocada por CRH es el uso de antagonistas específicos para cada uno de los receptores: la antisauvagina -30 (ASVG-30) fue desarrollada en 1998 por Rühmann y cols. y es un antagonista específico para CRH-R2; es casi 100 veces más potente en su unión con el receptor CRH-R2, con un K_i de 153.6 nM para CRH-R1 y un K_i de 1.4 nM para los receptores CRH-R2 β (Rühmann y cols., 1998). El bloqueo de CRH-R2 con el antagonista ASVG-30 provoca un aumento en la ingesta de alimentos y revierte los efectos anorexigénicos provocados por la inyección previa de CRH o Urc. (Pellemounter y cols., 2000 y 2002; Cullen y cols., 2001)

2.2.4 Relación del CRH y el hipotálamo lateral (HL).

En el HL existe un área destinada a la expresión de CRH en respuesta a la deshidratación. Esta área se conoce como HLA-crh (Kelly y Watts, 1996) y se sabe que cuenta con proyecciones hacia el área parvicelular del NPV (Watts y cols., 1999), que es el área responsable de la activación de los ejes HHT y HHA. El centro de esta región está

localizada dorsolateralmente al fórnix y rostrocaudal entre el NPV y el DMN (Watts; 1992; Watts y cols., 1995).

2.2.5 CRH en el estrés por deshidratación.

En la anorexia por deshidratación aumenta la expresión de RNAm de CRH y de neurotensina/neuromedina (NT/N) en el HLA-crh (Watts, 1992; Watts y cols., 1995; Watts y cols., 1998). Este cambio se produce inmediatamente después de la primera noche de consumo de la solución salina al 2.5% (modelo de estrés por deshidratación), cuando la deshidratación celular es el único estímulo presente (Watts, 1999; (Watts, 1996). El aumento en la expresión de RNAm de CRH no ha sido asociado a estimular la ingesta de agua, ya que inyecciones intracerebroventriculares (icv) de CRH y NT inhiben la ingesta de alimento después de periodos de restricción alimentaria, pero no estimulan la ingesta de líquidos (Levine y cols., 1983; Morley, 1987). Esto sugiere que la expresión de RNAm de CRH en la anorexia por deshidratación esta involucrada únicamente en la inhibición de la ingesta de alimento.

2.3.1 Características generales de la hormona liberadora de la tirotropina (TRH).

TRH fue el primer factor liberador descubierto en el humano por Guillemin y cols. en 1969. Este tripéptido es sintetizado en el hipotálamo en forma de un precursor, pro-TRH, el cual a su vez, es precursor de otros productos peptídicos: el precursor inmediato de TRH, TRH-Gly ,que es un péptido independiente a la conversión a TRH; prepro-TRH₁₆₀₋₁₆₉ (conocido como pST₁₀ o Ps₄) y prepro-TRH₁₇₈₋₁₉₉ (pFE₂₂) que son péptidos que se encuentran entre la tercera y cuarta, y la cuarta y quinta secuencia progenitora de TRH en el precursor de TRH, respectivamente; los péptidos N-terminales prepro-TRH₅₃₋₇₄ y propro-TRH₈₃₋₁₀₆ (pEH₂₄), entre otros. (Nillni y Severino, 1999)

2.3.2 Descripción de su papel como neurohormona y regulador del eje Hipotálamo-Hipófisis- Tiroides (HHT).

TRH cuenta con receptores membranales con los que interactúa. Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). En 1990, el primer receptor de TRH, TRH-R1, fue clonado del cDNA de un tumor en la glándula pituitaria de un ratón, dando lugar a la clonación del mismo receptor en otras especies como son la rata (del la Pena y cols., 1992; Zaho y cols., 1992; Sellar y cols., 1993) y el humano (Duthie y cols., 1993; Matre y cols., 1993). El receptor TRH-R1 presenta una

homología de 89.2% al receptor de la rata a nivel de DNA (Sun y cols., 2003). TRH-R1 es expresado ampliamente en la pituitaria anterior, las regiones neuroendocrinas del cerebro (como el hipotálamo), el sistema nervioso autónomo, y las regiones viscerales del tallo cerebral, por lo que se le responsabiliza de mediar las funciones neuroendócrinas de TRH (Nillnie y Severino, 1999; Sun y cols., 2003; Hinkle y cols., 2002; O'Dowd y cols., 2000).

Posteriormente en 1998 el receptor TRH-R2 fue identificado en rata (Cao y cols., 1998; Itadani y cols., 1998; O'Dowd y cols., 2000) y aún no ha sido identificado en humanos. TRH-R2 es expresado ampliamente en áreas que son importantes para la transmisión de señales somato sensoriales (área primaria somatosensorial y área motora entre otras) y en áreas importantes para las funciones del sistema nervioso central (corteza cerebral e hipocampo precomisural entre otras), lo que lo relaciona con procesos como el aprendizaje, la atención, el control motor y el procesamiento de señales sensoriales (Nillnie y Severino, 1999; Sun y cols., 2003; Hinkle y cols., 2002; O'Dowd y cols., 2000).

A pesar de que ambos receptores pueden ser estimulados por TRH con una similar afinidad de unión, TRH-R2 exhibe mayor activación en condiciones basales y se internaliza de manera más rápida que TRH-R1. Estas diferencias pueden ser importantes para el papel que tienen cada uno de los receptores en la fisiología de los mamíferos (Sun y cols., 2003)

Una de las funciones que caracteriza a TRH como hormona es la activación de HHT. El TRH es sintetizado a través del procesamiento post-traducciona l de pro-TRH mientras es transportado por la red trans-Golgi para formar parte de los gránulos de secreción. Estos gránulos ya maduros se dirigen a sitios de secreción de la membrana plasmática de la célula (Nillni y Severino, 1999). Esta síntesis ocurre en la parte medial del área parvicelular del NPV. De esta área se desprenden axones que se dirigen hacia la eminencia media, de donde TRH es liberado hacia el portal sanguíneo, desde donde viaja hasta la adenohipófisis en donde regula la síntesis y secreción de TSH, la cual a su vez viaja hasta la glándula tiroidea y estimula la secreción de las hormonas tiroideas T3 y T4 (de Gortari y Joseph Bravo, 2006; Morley, 1981). Las deiodinasas 1 y 2 (D1 y D2) son las enzimas que se encargan de convertir T4 en T3 activo mientras que la deiodinasa 3 (D3) se encarga de catalizar la inactivación de T4 y T3 (Kester y cols., 2006) Estas hormonas comparten varias funciones, entre las que destaca la regulación del balance energético y metabólico a través de la estimulación de casi todos los aspectos del catabolismo de

carbohidratos y lípidos en la mayor parte del cuerpo. Bajo condiciones normales, los niveles bajos de las hormonas tiroideas activan la síntesis de TSH y TRH en la adenohipófisis y el hipotálamo, respectivamente (Connors y cols., 1985; Koller y cols., 1987; Blake y cols., 1991). Los niveles plasmáticos de T3 y T4 están protegidos cuidadosamente por un mecanismo de retroalimentación negativa que reside en el hipotálamo y la hipófisis anterior (Lechan y Kakucska, 1992; Lechan, 1993). Cuando los niveles de las hormonas tiroideas decrecen, la biosíntesis de proTRH en las subdivisiones parvocelulares del NPV y mediales del hipotálamo se incrementa, mediada por una acción directa de T3 y T4 en los cuerpos neuronales hipofisiotróficos del TRH (Segerson y cols., 1987; Dyess y cols., 1988; Koller y cols., 1987; Kakucska y cols., 1992). Esto provoca la secreción de TRH y de los productos de proTRH en el plexo portal capilar para el transporte a la hipófisis anterior, incrementando de esta manera la secreción de TSH y por lo tanto de T3 y T4. De forma contraria, cuando los niveles de las hormonas tiroideas son elevados, la biosíntesis de TRH en las neuronas hipofisiotróficas del NPV se inhibe (Segerson y cols., 1982, Koller y cols., 1987).

El TRH liberado es inactivado por una metaloenzima neuronal específica, la piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) (Cruz y cols., 1991; Garat y cols., 1985; O'Connor y O'Cuinn, 1984). Esta enzima es altamente específica para el TRH. Cuando esta enzima ha sido inhibida, las concentraciones de TRH *in vitro* incrementan, lo que apoya su función degradativa (Charli y cols., 1989). Se puede encontrar ampliamente en la adenohipofisis, donde es regulada en condiciones donde el TRH es deficiente, como en el hipotiroidismo (Bauer, 1988; Ponce y cols., 1988). Además, se ha observado que, en un cultivo de células de la adenohipofisis, el TRH disminuye la actividad de la PPII, por medio de la activación de sus receptores, a un 54% con respecto al control, después de 16 hrs., de la incubación con TRH (Vargas y cols., 1994) lo que deja ver que TRH puede regular la actividad de la enzima. Una inyección intraperitoneal (ip) de T3 aumenta la concentración de RNAM de PPII en la adenohipofisis 10 veces con respecto al control y que en ratas hipotiroideas tratadas con n-propiltiouracilo, el RNAM de PPII disminuye a 50 % con respecto al control en el primer día de tratamiento en la adenohipófisis, por lo que se considera que las hormonas tiroideas son también reguladoras de la actividad de PPII y que además, esta actividad es específica en la adenohipofisis (Shomburg y Bauer, 1995; Lin y Wilk, 1998). Por otro lado, estudios *in vivo* han demostrado que la actividad de PPII en la adenohipofisis también puede ser regulada durante el ciclo estral en ratas y por

cambios en los niveles de estrógeno, ya que el aumento de los mismos provoca una disminución en la expresión de PPII, y que esta actividad, como aquella ejercida por las hormonas tiroideas y por el propio TRH, es específica para la adenohipofisis (Uribe y cols., 1991; Pomnce y cols., Bauer, 1988; Vargas y cols., 2000)

Existen también otros péptidos que tienen la capacidad de regular a TRH. La corticosterona, que es el principal glucocorticoide en ratas, es uno de ellos. Las ratas adrenalectomizadas presentan un aumento en la concentración de RNAM de proTRH en el NPV mientras que el consumo de glucocorticoides de forma oral, a través del agua de consumo, causa una disminución del mismo (Kakucska y cols., 1995).

Además de sus funciones hipofisiotrópicas, TRH también está implicado con otros sistemas. Se expresa en varias áreas del cerebro además del hipotálamo y, en conjunto con las observaciones que lo implican como modulador tanto de la actividad neuronal que da lugar a convulsiones generalizadas en rata como en la motilidad gastrointestinal, se observa que TRH actúa también como neuromodulador (Kubek y cols., 1989; Tache y cols., 1989).

TRH también cumple otras funciones distintas a las neuromoduladoras, ya que también regula la respuesta al frío en términos de la temperatura corporal (Choi y cols., 2002).

Esta hormona también se encuentra también en el tracto gastrointestinal, el páncreas, tejidos reproductores incluyendo placenta, ovarios, testas, vesículas seminales y próstata, retina y elementos sanguíneos (Lechan, 1993).

2.3.3 Participación de TRH en la conducta alimentaria.

TRH tiene también efectos sobre la ingesta de alimento. Se ha observado que en la restricción alimentaria y ayuno, los niveles de RNAM de TRH en el NPV disminuyen del mismo modo que los niveles de TSH, T3 y T4 en suero (Blake y cols., 1991; Zigman y Emquist, 2003; Joseph-Bravo, 2004; Jaimes 2006) lo que sugiere que los cambios en las hormonas tiroideas se deben a una reducción en la secreción y producción de TRH. En estas condiciones la secreción excesiva de corticosterona tiene un efecto regulatorio importante en la disminución de la síntesis de TRH y TSH (van Haasteren y cols., 1995; Légrádi y cols., 1997). La restricción alimentaria prolongada (por 3 semanas con reducción a 1/3 del consumo de alimento normal), no induce disminución en la expresión

de RNAM de proTRH pero sí un aumento de TRH en la eminencia media, lo que indica que los cambios observados en el eje HHT se dan por una inhibición en la secreción, evento que a su vez parece estar mediado por los altos niveles de corticosterona sérica (Van Haasteren, 1996).

Sin embargo, se ha observado que la activación del eje HHA y la inhibición del eje HHT que causa la restricción alimentaria puede ser inhibida por una inyección ip o icv de leptina en ratas (Ahima y cols., 1996; Legradi y cols., 1997; Fekete y cols., 2005). A través de análisis inmunocitoquímicos, se ha demostrado que alrededor de 40-50% de las células del hipotálamo tienen receptores para leptina y que un 15% de estas células expresan también TRH evidenciando que la leptina actúa directamente en las neuronas TRHérgicas (Nillni y cols., 2000) Además se ha demostrado que dependiendo de la dosis de leptina, ésta puede estimular el aumento de preproTRH, proTRH y la secreción de TRH (Nillini y cols., 2000).

La leptina también puede regular la expresión de TRH indirectamente. Se han encontrado proyecciones de neuronas del ARC, así como terminales axónicas de α -MSH y AgRP a neuronas TRHérgicas (Legradi y Lechan, 1998; Fekete y cols., 2000). Actuando indirectamente en el ARC, la leptina regula la expresión de POMC y de α -MSH (péptidos anorexigénicos), inhibiendo a NPY y a la AgRP (péptidos orexigénicos), provocando posteriormente efectos en los receptores de melanocortina (MC4Rs), los cuales se encuentra también en neuronas TRHérgicas en el NPV, regulando así la expresión de TRH (Fekete y Lechan, 2006; Harris y cols., 2001; Kim y cols., 2000).

Todo esto responde a una adaptación del eje HHT, en donde la disminución de ingesta y por ende, de la energía recibida por el organismo inhiben los mecanismos como la lipólisis, ya que uno de los componentes importantes de la homeostasis energética es la manutención del peso en un punto estable.

Estas respuestas en la restricción alimentaria, aunadas a las observaciones que sustentan que TRH puede ser importante en la disminución de la ingesta de alimento, a través de la inyección subcutánea o intracraneal o intraventricular (Choi y cols., 2002; Suzuki y cols., 1982; Vijayan y cols., 1977; Vogel y cols., 1979; Lin y cols., 1983; Morley y cols., 1982), proponen a este péptido como un factor anorexigénico.

2.4.1 Modelos de anorexia: estrés por deshidratación.

Existen varios modelos animales que permiten estudiar la anorexia. Estos modelos están basados en perfiles clínicos de la enfermedad. Entre ellos se encuentran el estrés por separación (que consiste en separar a las crías de las madres), las dietas de restricción, la actividad física, la inhibición de la ingesta de alimentos provocada por el síndrome de abstinencia a las anfetaminas, el estrés provocado por un ambiente nuevo, entre otros (Hao y cols., 2001; Siegfried y cols., 2003; Hisieh YS y cols., 2005; Connan y cols., 2003). El estrés por deshidratación es un modelo animal de anorexia que consiste, en la ingesta *ad libitum* de una solución salina al 2.5% en lugar del agua que las ratas consumen normalmente, manteniendo *ad libitum* de alimento sólido (Watts, 1999); la deshidratación prolongada en los animales induce al organismo a buscar alternativas para mantenerse hidratado, suprimiendo procesos que requieren gasto de agua como lo ocasiona la digestión, que elimina agua a través de la excreción colónica. Así, los animales reducen dramáticamente su consumo de alimentos (Watts y cols., 1999).

En respuesta a la deshidratación, que genera anorexia, péptidos neuronales relacionados con el control de la conducta alimentaria modifican su expresión. Esta anorexia comparte ciertas señales neuronales con la restricción alimentaria: los niveles de RNAM del NPY incrementan, mientras que los de POMC y neurotensina (NT) disminuyen en ARC. A nivel sérico, se incrementan los niveles de glucocorticoides circulantes, pero se reducen los niveles de leptina e insulina. Sin embargo, la anorexia por deshidratación presenta además un aumento en la concentración de RNAM de CRH en el HL. Este incremento de RNAM de CRH en el HL es inmediato ya que se ha detectado desde la primera noche que las ratas son expuestas a la ingestión de solución salina, siendo la deshidratación celular el único estímulo presente (Watts y cols., 1995).

En el laboratorio se estudió la respuesta del eje HHT en este paradigma observando que, a diferencia de lo que ocurre en restricción alimentaria donde se produce un hipotiroidismo terciario (disminución del contenido de RNAM de TRH en el NPV, I de T4 y TSH en suero) (Blake et al., 1991; Van Haasteren y cols., 1996), animales donde se indujo anorexia por deshidratación presentaron niveles de RNAM de TRH en NPV parecidos a los de los animales que consumen alimento *ad libitum* y las concentraciones séricas de TSH y T4 aumentan, lo que indica que el eje HHT se encuentra más activo en comparación con la restricción alimentaria (RA) a pesar del déficit energético (Jaimes, 2003 y 2006).

Algunos de estos cambios han sido estudiados en periodos de 7 días, pero se desconoce la cinética de cambios que se da en ese periodo de tiempo.

2.4.2 TRH en el estrés por deshidratación.

En este laboratorio se han observado los cambios de TRH en el modelo de estrés por deshidratación. Entre los resultados obtenidos, en un periodo de 7 días de deshidratación, destacan los siguientes:

- ✓ El contenido de RNAm de TRH en el NPV se encuentra reducido en la restricción alimentaria, pero no en la anorexia inducida por deshidratación.
- ✓ El contenido de TRH en la eminencia media se encuentra aumentado en la restricción alimentaria, mientras que en la anorexia inducida por deshidratación está disminuido, lo que sugiere una liberación hipotalámica de TRH en la anorexia (Jaimes, 2003 y 2006)
- ✓ Existe una regulación diferencial del RNAm de CRH-R2 en el NPV entre la restricción alimentaria y la anorexia, hecho que sugiere que este receptor podría estar participando en la inhibición de la ingesta de alimento y en los cambios en la expresión de CRH en el HL (Jaimes 2006)

3.0 JUSTIFICACIÓN

La anorexia es un trastorno alimentario que ha cobrado gran importancia en estos tiempos. Se calcula que el 0.5-1.5% de mujeres adolescentes lo padecen (Gonzales y cols., 2003; Muñoz y Argente, 2002).

Este trastorno está asociado a desórdenes de los ejes HHA y HHT (Connan y cols., 2003; Støving y cols., 1999). El modelo de anorexia por estrés por deshidratación prueba también un desorden en estos ejes, en donde el RNAM de CRH del HL en ratas anoréxicas se encuentra aumentado con respecto al control pero no en las de restricción alimentaria (Watts y cols., 1999). Los niveles de RNAM de TRH en el NPV de ratas anoréxicas son parecidos a los del control, mientras que las ratas sometidas a restricción alimentaria presentan una disminución (Jaimes, 2006 y 2003). Estos cambios se han reportado después de un periodo de deshidratación de 7 días. Sin embargo, se desconoce cómo es que estos cambios neuroendocrinos van apareciendo y si todos estos cambios son evidentes desde el primer día.

Además de esto, se ha demostrado que las neuronas CRHérgicas localizadas en el HL que tienen un aumento en la expresión de CRH durante la deshidratación tienen proyecciones eferentes hacia el NPV, área parvicelular (Watts y cols., 1999) y esto, en conjunto con el aumento de RNAM de CRH en HL durante la anorexia por deshidratación, sugiere que el CRH puede estar regulando la expresión de TRH en el NPV. Las neuronas TRHérgicas reciben proyecciones de las CRHérgicas y existe una disminución de CRH-R2 en el NPV exclusivamente en el grupo de anorexia por deshidratación, por lo que se plantea que el CRH puede ser el responsable de la ausencia de la disminución de TRH en el estrés por deshidratación (Jaimes, 2006).

Esto es también congruente con las observaciones sobre el CRH-R2, que indican que es el receptor blanco del CRH en procesos de inhibición de la ingesta de alimento (Bale y cols., 2000; Vaughan y cols., 1995; Spina y cols., 1996), papel que ha sido comprobado por el uso del antagonista específico para CRH-R2, ASVG-30, en diversos estudios (Pelleymounter y cols., 2000 y 2002; Cullen y cols., 2001).

Además, se sabe que existe expresión del receptor de CRH-R2 en el NPV (Cone, 2000), área que además posee neuronas TRHérgicas.

4.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Definir la participación del receptor CRH-R2 en la regulación de la síntesis de TRH en el NPV y los cambios en el eje tiroideo de ratas bajo estrés por deshidratación, así como las consecuencias conductuales y endocrinas en la conducta alimentaria que este fenómeno conlleve.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar y describir la cinética de cambios en la expresión de RNAM de hormonas y receptores involucrados con la anorexia en el modelo de estrés por deshidratación durante 7 días.
- Evaluar y describir la interacción entre CRH y TRH en el modelo de estrés por deshidratación durante 7 días.
- Evaluar y describir la relación entre la dosis del antagonista al receptor CRH-R2, antisauvagina-30, y los cambios en la expresión de RNAM del receptor CRH-R2.
- Comparar los cambios producidos en la expresión de RNAM de las hormonas y los receptores involucrados en la anorexia por el modelo de estrés por deshidratación, entre hembras y machos .

5.0 HIPÓTESIS

El bloqueo de los receptores de CRH-R2 ubicados en el NPV contrarrestará la conducta de anorexia, la activación de las neuronas TRHérgicas del NPV y las alteraciones del eje tiroideo en el modelo el estrés por deshidratación.

6.0 METODOLOGÍA

CINÉTICA DE CAMBIOS EN LOS EJES HHA Y HHT DURANTE 7 DIAS DE ESTRÉS POR DESHIDRATACIÓN.

Experimentos previos realizados en un periodo de 7 días con hembras indican que existe una regulación diferencial de la expresión de proTRH en el NPV del hipotálamo y una activación diferencial del eje HHT entre los grupos de deshidratación (AX) y de restricción alimentaria (RA). Puesto que la reducción en el consumo de alimento y de peso se registra desde el día 1 ó 2, sería posible encontrar los cambios que distinguen a la AX por deshidratación desde estos días. Por esta razón, sometimos a un grupo de animales hembras y otro de machos a estrés por deshidratación y sacrificamos, en el caso de hembras, un cuarto de cada grupo en los días 1, 3, 5 y 7. En este caso, los cambios más tempranos aparecieron en el día 3, por lo que decidimos empezar la cinética de machos a partir de ese día, sacrificando a los animales en los días 3, 5 y 7. La aparición de los cambios asociados a AX determinarían el número de días de inyección del antagonista específico a CRH-R2 (antisauvagina-30); el grupo de machos se añadió para definir diferencias en la respuesta por género a la deshidratación, pero también porque tienen mayor peso al inicio lo que facilita la canulación para el experimento de la inyección de la antisauvagina.

Animales

Con objeto de definir el curso temporal de los cambios en la expresión de proTRH en el NPV del hipotálamo, los animales se sometieron a estrés por deshidratación por 7 días y se sacrificaron a diferentes tiempos. Las ratas hembras y machos de la cepa Wistar (n=40 para hembras y n=30 para machos), con peso promedio de 240 g para ambos sexos, fueron mantenidas por una semana en periodo de habituación en cajas individuales con condiciones controladas: ciclo de 12-12 horas de luz-oscuridad (luz: 7 am- 7pm) y temperatura de 22 ° C, con consumo de alimento (Lab-Chow 5001) y agua *ad libitum*. Tanto el peso corporal como la cantidad de alimento consumida se registraron diariamente. El consumo de alimento se obtuvo por diferencia de peso entre lo que se les ofreció (50 g) y lo que dejaron al día siguiente. El registro se realizó siempre entre 11 y 12 pm.

Las ratas machos y hembras fueron asignadas a uno de los siguientes grupos: **control (C)**, n=12 ó 9 para hembras o machos respectivamente, con consumo ad libitum de agua

y alimento; **anorexia por deshidratación (AX)** n=16 ó 12 para hembras o machos respectivamente, con consumo de agua con NaCl al 2.5%; **pareado (RA)** n=12 ó 9 para hembras o machos respectivamente, a los que se ofreció sólo la cantidad de alimento consumida por el grupo AX (promedio del consumo de 6 experimentos anteriores). Una parte de animales hembras de cada grupo (n=4 ó 3) fueron sacrificados el día 1, ó 3 ó 5 ó 7, mientras que los machos (n=4 ó 3) se sacrificaron el día 3 ó 5 ó 7. El sacrificio se realizó por decapitación, se extrajeron los cerebros y adenohipofisis y se guardaron a -70°C para su posterior análisis. La sangre del tronco fue colectada y una vez que se formó el coágulo, se centrifugó a 4000 rpm y 3°C por 20 min.; el suero se extrajo para analizar el contenido de tirotrópina (TSH), hormonas tiroideas (T3 y T4) y corticosterona por radioinmunoensayo (RIA).

Los cerebros fueron disecados en congelación obteniendo las regiones del NPV, e hipotálamo lateral izquierdo y derecho (Paxinos y Watson, 2003). De cada región se extrajo el RNA (Chomczynski y Sacchi, 1986) y se semicuantificó el contenido de RNAM de proTRH y CRH-R2 en el NPV, proCRH en el HL, y proTRH-R1 y PPII en adenohipofisis por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

INYECCIÓN DE ANTISAUVAGINA-30 EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTALAMO.

Animales

Ratas macho de la cepa Wistar (n=12), con peso aproximado de 306 gramos (rango: 265-376 g), se mantuvieron en el bioterio en condiciones controladas de luz y temperatura (similares a las descritas anteriormente) con agua y alimento ofrecido *ad libitum*, por dos semanas tanto antes como después de la inserción de la cánula. El peso corporal, el alimento y el agua consumidos se registraron diariamente.

Cirugía: canulación

Las ratas fueron anestesiadas con Ketamina (Anestek) y Xilacina (Rompum), siendo la dosis dependiente al peso (73.3 unidades de Ketamina/kg y 60 unidades de Xilacina/kg) posteriormente, la cabeza fue rasurada y limpiada con yodo y alcohol. Las ratas se colocaron en el marco estereotáxico y por medio de un bisturí el cráneo fue expuesto y el tejido periótico separado con una legra. Las coordenadas estereotáxicas del área parvicelular anterior del núcleo paraventricular del hipotálamo, son AP= -1.08; L= 0.2; V= 7.2 (Paxinos y Watson, 2003). La cánula (12mm de largo) fue introducida a través de un

aparato estereotáxico, procurando restar 1 mm a la coordenada vertical final para la correcta colocación del inyector y una vez en sitio, se colocó en el trépano una esponja quirúrgica absorbente y cera de osso® (utilizada en el tejido óseo para detener hemorragias) para sellar. Inmediatamente se colocó acrílico dental tanto en la base de la cánula como en los tornillos (acero, 4 mm) para fijar todo al cráneo. Una vez seco el acrílico, se separó la cánula de la torre del aparato estereotáxico y se colocó acrílico dental adicional. Cuando se secó la última capa de acrílico, se procedió a suturar y a colocar pomada amarilla® (pomada antiséptica y cicatrizante de uso veterinario). Posteriormente, se otorgó un periodo de recuperación y cicatrización de una semana a todos los individuos. Las ratas fueron colocadas, desde la implantación hasta el final del experimento, en cajas individuales con tapas invertidas con el propósito de evitar lesiones provocadas por el roce de la cánula y la tapa. Las infecciones eventuales fueron tratadas con pomada amarilla® y agua destilada. Las tapas o mandrilaes de las cánulas fueron removidos diariamente con pinzas para evitar el atascamiento provocado por las sales del líquido cerebral. Aquellos individuos que por alguna razón perdieron el implante o lo cambiaron de posición o que sufrieron infecciones de gravedad, fueron sacrificados con CO₂, de acuerdo a las normas éticas del uso de animales de laboratorio bajo las cuales se rige el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente.

Grupos experimentales:

Se formaron 4 grupos de animales aleatoriamente, los cuales fueron inyectados diariamente durante 7 días con 1 µl de las siguientes sustancias y dosis: **1) DA:** ASV-30 dosis alta (60 nmol / 1 µl) , **2) DM:** ASV-30 dosis media (30 nmol / 1 µl), **3) DB:** ASV-30 dosis baja (15 nmol / 1 µl) y **4) CAX:** solución salina al 0.9% (1 µl). Todos los grupos fueron sometidos a estrés por deshidratación, ofreciéndoseles sólo agua con sal al 2.5% como líquido para beber y la misma clase de alimento descrito para los experimentos anteriores.

Diariamente durante 7 días, las ratas de los grupos DA, DM y DB recibieron una inyección de ASV-30 o solución salina, dependiendo de su grupo, a través de la cánula y con la ayuda de una jeringa Hamilton de 5 µl conectada por un cateter a un inyector de 13 mm, el cual se colocó manualmente manteniendo a la rata en libre movimiento. La dosis correspondiente a cada grupo se inyectó paulatinamente en un lapso de 10 segundos con una pausa de 1 minuto para finalmente retirar el inyector y colocar de nuevo el mandril de la cánula.

En el octavo día del experimento todos los animales se sacrificaron por decapitación, la adenohipófisis y el cerebro se extrajeron y guardaron a -70°C para su posterior disección (en NPV, e hipotálamo lateral izquierdo y derecho (Paxinos y Watson, 2003) y semi-cuantificación de RNAM de proTRH y CRH-R2 en el NPV, proCRH en el HL además de TRH-R1 y PPII en adenohipófisis. La sangre fue colectada en tubos esterilizados y una vez que se formó coágulo fue centrifugada (20 min, 4000 rpm, 3°C) y el suero extraído para analizar el contenido de tirotropina (TSH), hormonas tiroideas (T3 y T4) y corticosterona por RIA.

Extracción de RNA

Cada una de las secciones disecadas (NPV, HLi, HLd) así como la adenohipofisis, fueron sometidas a extracción de RNA por el método de Tiocinato de Guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1986). Se calculó la cantidad necesaria de solución D (4 M de Tiocinato de Guanadina, 25mM de citrato de sodio, 0.5% de sacrosil pH 7) para cada tejido (1 ml de solución D por cada 100 mg de tejido) y una vez separada esta cantidad en condiciones asépticas, se le agregaron 35 μl de β - mercaptoetanol por cada 5 ml de solución D. El tejido fue colocado en hielo seco y posteriormente, se le agregó la cantidad correspondiente de solución D: para NPV, HLi y HLd = 150 μl ; para adenohipófisis 100-120 μl . Esta cantidad corresponde en cada caso a 1 volumen. Posteriormente, el tejido fue tratado con ondas ultrasónicas (Sonics Vibra- Cell, Ultrasonic Processor) para crear una solución homogénea y a la mezcla resultante se le agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio, 1 vol de fenol saturado (con agua tratada con dietilpirocarbonato, DEPC), y 45 μl de una mezcla cloroformo-isoamílico (24:1). Pasados 15 min., los tejidos fueron centrifugados a 3°C a 10,000 rpm durante 20 min. (Eppendorf, Centrifuge 5810 R). Al terminar la centrifugación, se separó la fase acuosa con ayuda de una pipeta y se le agregó 1 vol de isopropanol al 99.96% y se dejó reposando toda la noche a -22°C .

El día siguiente se lavaron las muestras: se comenzó centrifugándolas a 14,000 rpm durante 30 min a 3°C ; se decantó el isopropanol y se colocó 1 vol de etanol al 75%, se agitó con un vórtex (Daiger Vorteg, Genie 2) hasta que se separó el precipitado del fondo del tubo; se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones por 12 min., y se decantaron. El procedimiento se repitió 2 ocasiones más. El RNA se secó bajo vacío (Eppendorf, Vacufuge) y cada muestra se disolvió en 10 μl de agua tratada con DEPC. Se procedió a la cuantificación del RNA presente con la ayuda de un biofotómetro (Eppendorf, Biophotometer) a 260 nm. Se determinó la relación entre el contenido de RNA

vs el de sales midiendo a 230 nm y el de RNA vs el contenido de proteínas a 280 nm. Sólo cuando la relación de ambos parámetros fue igual o mayor a 1.5 se utilizó el RNA para determinaciones posteriores (de lo contrario se procedió a lavar como está descrito arriba). Una vez calculada la cantidad de RNA (1O.D. = 40 µg de RNA), se observó el grado de degradación introduciendo una alícuota de 0.5 µg de RNA en 4 µl de agua en un gel de agarosa al 1 % (0.75 g de agarosa Standard Lowm (Biorad), 15 ml de TBE 5 X (buffer) y 45 ml de agua miliQ esteril). Si la relación entre la densidad de las bandas de los RNAs de 28s y 18s es mayor a 1 se procedió a realizar la transcripción reversa del RNA y posteriormente la PCR.

Todas las soluciones y el material utilizado en este procedimiento fueron debidamente esterilizados y/o tratados con DEPC.

Reacción en cadena de la polimerasa- transcriptasa reversa (RT- PCR)

Las alícuotas de RNA se calentaron (1 µg /12 µl de agua) en baño maría a 65 ° C durante 5 min, y posteriormente las muestras se colocaron directamente en hielo. Se adicionó la mezcla de RT a cada tubo: 8.9 µl de agua bidestilada con DEPC, 6.0 µl de buffer RT 5X (250 mM Tris- HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 30 µl ditioneitol (DTT) 0.1 M 10 X. 0.6 µl de dNTPs 10 mM, 1.0 µl de oligo dT 0.5 µg /µl y 0.5 µl de transcriptasa reversa (M- MLV RT, 200 u/µl). Las muestras se incubaron a 37 ° C durante dos horas. Al término de la incubación se tomaron 4 µl de la mezcla de reacción cDNA y se adicionó la mezcla de PCR a cada muestra que contiene: 33.5 µl de agua bidestilada estéril con DEPC, 5 µl de buffer Taq DNA polimerasa (5 u/µl) 10 x, 1.0 µl de dNTPs 10 mM, 1.0 µl del correspondiente oligonucleótido sentido, 1.0 µl del correspondiente oligonucleótido correspondiente antisentido 1.5 µl de MgCl 1.5 mM y 0.5 µl de Taq DNA polimerasa 5 u/ µl (Invitrogen, Taq DNA polymerase, recombinant).

Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient). En el anexo 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos estudiados, así como de los genes controles y en el anexo 2 los ciclos y condiciones de amplificación para cada gen y cada región del cerebro a ser estudiada.

Después de la amplificación de los genes se realizó una electroforesis para semicuantificar los productos. La ciclofilina se utilizó como gel control dr TRH, TRH-R1, TRH-R2, CRH-R2 y PPII; se utilizó la ciclofilina en este caso ya que el tamaño del amplificado es diferente a los genes en estudio, permitiendo que las bandas en el gel se separen. El G3PDH se utilizó como gen control del CRH, por la misma razón que en el

caso de la ciclofilina. Se preparo un gel de agarosa al 2%. los geles de agarosa se prepararon de la siguiente manera: para 75 ml se usaron 1.5 g de agarosa Standard-lowm (Biorad), 15 ml de TBE 5X y se aforó a 75 ml con agua miliQ.

Del producto del PCR se tomaron 12 µl del gen en cuestión, 4 µl del gen control y se adicionaron 2 µl de loading buffer (0.025 g de azul de bromofenol, 0.025 de xileno cianol, 5ml de glicerol) para teñir el DNA y que se observen las bandas de electroforesis en un transiluminador. Posteriormente se realizó la semicuantificación de los genes en estudio por densitometría utilizando el programa de American Applied Biotechnology

Radioinmunoensayo de T4

Para medir la concentración sérica de T4 se utilizó el kit "Coat-A-Count total T4" de la marca DPC; la sensibilidad del ensayo es de 0.25 µg/ dl y el antisuero de "Coat-A Count total T4" es altamente específico para la T4 , con una reactividad cruzada del 100% para la T4 (dosis mínima detectable = 0.25 µg/dl.) y extremadamente baja para con otros compuestos que se encuentran de manera natural en las muestras. Además la presencia de diferentes concentraciones proteicas en las muestras no tienen efecto significativo con el ensayo de "Coat-A-Count total T4".

El radioinmunoensayo es de fase sólida en donde la T4 marcada con ¹²⁵I compete durante un tiempo fijo con la T4 de la muestra problema por sitios de unión con el anticuerpo. Esta reacción tiene lugar en presencia de agentes bloqueadores que sirven para liberar la T4 unida de las proteínas transportadoras. De ahí que el ensayo mide T4 total ya que tanto la T4 libre como la unida a proteínas pueden competir con la T4 ¹²⁵I por los sitios de unión del anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado a la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de T4 ¹²⁵I unida al anticuerpo.

Antes de iniciar el procedimiento todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente. Se marcaron cuatro tubos de ensayo: 2 tubos T y dos tubos NSB. De los tubos recubiertos con "T4 total Ab" se marcaron por duplicado los correspondientes a la curva estándar desde la A (unión máxima) hasta la F; la curva va de 0, 1, 4, 10, 16 y 24 µg/ dl de T4; también se marcaron por duplicado los tubos para las muestras. Posteriormente se colocaron 25 µl del calibrador cero en los tubos de unión no específica (NSB) y A y 25 µl de cada uno de los calibradores restantes y de las muestras sin diluir en su respectivo tubo. Se agrego 1 ml de ¹²⁵I T4 total a todos los tubos y se agitaron con vórtex breve y

suavemente. Se incubaron los tubos durante una hora a 37 ° C en baño maría. Después de la incubación se decantaron por completo todos los tubos excepto los T. Finalmente se cuantificaron las muestras en el contador gamma durante 1 min por tubo. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras problema a µg de T4 utilizando el software “Enri” de transformación matemática a través de una regresión de logit-log. Los resultados se expresan en µg/ dl.

Radioinmunoensayo de T3

Para medir la concentración sérica de T3 se utilizó el kit “Coat- A – Count total T3” de la marca DPC; la sensibilidad del ensayo es de 7 ng/dl y el antisuero utilizado es altamente específico para T3 (dosis mínima detectable= 7 ng/dl), con una reactividad cruzada del 100% para la T3 y extremadamente baja con otros compuestos que se encuentran de manera natural en las muestras. Además la presencia de diferentes concentraciones proteicas en las muestras no tienen efecto significativo con el ensayo de T3”.

Se realizó un ensayo en fase sólida en donde la T3 marcada con ¹²⁵I compete durante un tiempo fijo con la T3 de la muestra problema por sitios de unión con el anticuerpo. Esta reacción tiene lugar en presencia de agentes bloqueadores que provocan la liberación de T3 unida a las proteínas transportadoras, por lo que es posible medir T3 total ya que tanto la T3 libre como la unida a proteínas puede competir con la T3 ¹²⁵I por los sitios de unión del anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado a la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de T3 ¹²⁵I unida al anticuerpo.

Antes de iniciar el procedimiento todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente. Se marcaron cuatro tubos de ensayo: 2 tubos T y dos tubos de unión no específica (NSB) que no contienen anticuerpo (Ab). De los tubos recubiertos con Ab, se marcaron por duplicado los que corresponden a la curva estándar desde la A (unión máxima) hasta la F; la curva va de 0, 20, 50, 100, 200 y 600 ng/ dl de T3; también se marcaron por duplicado los tubos para las muestras problema. Posteriormente se colocaron 100 µl del calibrador cero a en los tubos NSB y A y 100 µl de cada uno de los calibradores restantes y de las muestras sin diluir en cada tubo previamente marcado. Se agregó 1 ml de ¹²⁵I T3 total a todos los tubos y se agitaron con un vórtex breve y suavemente. Se incubaron los tubos durante 2 horas a 37 ° C en baño maría. Después de la incubación se decantaron por completo los tubos excepto los T. finalmente se

cuantificaron las muestras en el contador gamma durante 1 min por tubo. Se transformaron los valores de cpm de la curva estandar y de las muestras a ng de T3 utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una regresión de logit-log. Los resultados se expresan en ng/ dl.

Radioinmunoensayo de Corticosterona

Para medir la concentración sérica de corticosterona se utilizó el kit "Coat-A-Count rat corticosterona" de la marca DPC; la sensibilidad del ensayo es de 7 ng/dl y el antisuero es altamente específico (dosis mínima detectable = 5.7, 95% B/Bo) con una reactividad cruzada del 100% para la corticosterona y extremadamente baja con otros compuestos que se encuentran de manera natural en las muestras. Además la presencia de diferentes concentraciones proteicas en las muestras no tienen efecto significativo con el ensayo de corticosterona.

El ensayo es de fase sólida en donde la corticosterona marcada con ^{125}I compete durante un tiempo fijo con la corticosterona de la muestra problema por sitios de unión con el anticuerpo. Esta reacción tiene lugar en presencia de agentes bloqueadores que sirven para liberar la corticosterona unida a proteínas transportadoras. De ahí que el ensayo mida corticosterona total ya que tanto la corticosterona libre como la unida a proteínas puede competir con la ^{125}I corticosterona por los sitios de unión del anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado a la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de ^{125}I corticosterona unida al anticuerpo.

Antes de iniciar el procedimiento todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente. Se marcaron cuatro tubos de ensayo: 2 tubos T y dos tubos NSB. De los tubos recubiertos con anticuerpo anti corticosterona (Ab), se marcaron por duplicado los correspondientes a la curva estandar desde la A (unión máxima) hasta la H; las concentraciones de la curva van de 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 ng/ dl de corticosterona; también se marcaron por duplicado los tubos para las muestras problema. Posteriormente se adicionaron 50 μl del calibrador cero a los tubos NSB y A y 50 μl de cada uno de los calibradores restantes y de las muestras sin diluir en cada tubo previamente marcado. Se agrego 1 ml de ^{125}I rat corticosterone a todos los tubos y se agitaron con vórtex breve y suavemente. Se incubaron los tubos durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación se decantaron por completo los tubos

excepto los T y se cuantificaron en el contador gamma durante 1 min por tubo. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de corticosterona utilizando el software “Enri” de transformación matemática a través de una regresión de logit-log. Los resultados se expresan en ng/ ml.

Radioinmunoensayo de TSH

La curva estándar (por triplicado) y los controles (por duplicado) fueron preparados de la siguiente manera: a los tubos NSB se les adicionaron 300 µl de amortiguador RIA (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.25% BSA + 50 mM EDTA); a los tubos de unión máxima o Bo se les adicionaron 200 µl del amortiguador RIA y 100 µl de anticuerpo contra TSH (Ab) (1 µl Ab contra TSH en 300 µl amortiguador, dilución 1: 375,000). Posteriormente, se preparó la curva estándar de TSH con 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg/200 µl del amortiguador RIA y se les adicionaron 100 µl de Ab. También se preparó una curva con suero de ratas controles (eutiroideas) como estándar interno. Se prepararon tubos con 10, 25, 50, 100 y 200 µl de suero, se completaron a 200 µl con amortiguador RIA y se adicionaron 100 µl de Ab contra TSH.

Simultáneamente, se prepararon tubos de las muestras problema, se tomaron 100 µl de suero de cada muestra y se adicionaron a todos los tubos 100 µl de Ab contra TSH y 100 µl de amortiguador RIA para obtener un volumen final de 300 µl.

Posteriormente, se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente por 18-24 horas. Terminado el tiempo de incubación, se adicionaron a todos los tubos 100 µl de ¹²⁵I – TSH (10,000 cpm) y se incubaron de nuevo a temperatura ambiente entre 18 a 24 horas. Después se adicionaron a los tubos (excepto a los T) 1 ml de polietilenglicol al 4 % en PBS y se centrifugaron a 5,000 rpm a 4°C durante 30 min. Se aspiró el sobrenadante y se procedió a la lectura de cada tubo en un contador de radiaciones gamma.

Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de TSH utilizando el software “Enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en ng/ml.

Análisis estadísticos

Se realizaron en todos los experimentos, análisis de varianzas de una vía (ANOVA) de una vía proseguida de la prueba post-hoc de Fisher con el objetivo de determinar, para cada variable medida (RNAM de CRH-R2, RNAM de proTRH, peso, etc), las diferencias entre cada grupo experimental (control, AX y RA), considerando una diferencia significativa

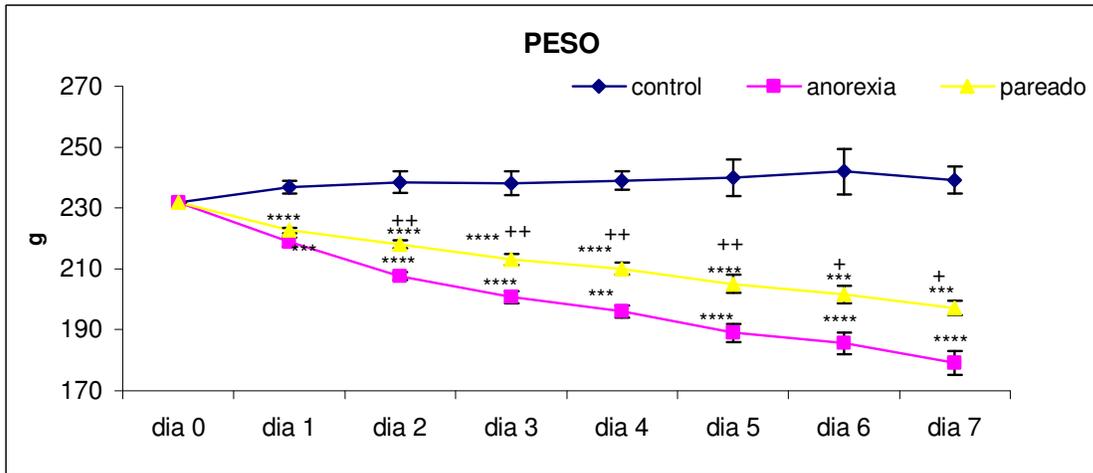
a partir de $p < 0.05$. En el caso específico de la comparación entre machos y hembras se realizó una ANOVA de 3 vías.

7.0 RESULTADOS.

7.1 Cinética de cambios durante 7 días de estrés por deshidratación en hembras.

Hembras.

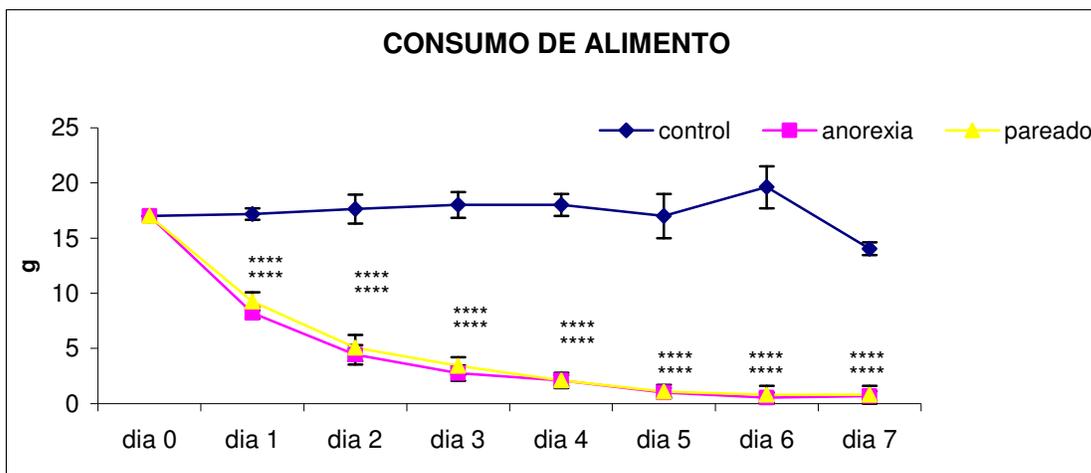
Figura 1. Peso



Cambios en el peso corporal durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en hembras. Valores expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de gramos \pm EEM, $238 \pm 1g$). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p<0.05$. Diferencias vs control: $***p<0.001$, $****p<0.0001$; diferencias con AX: $++p<0.01$, $+p<0.05$.

Desde el día uno del experimento disminuyó el peso corporal en el grupo AX ($92 \pm 0.6 \%$) y RA ($94 \pm 0.4 \%$), ($p<0.0001$) en comparación con el control ($100 \pm 0.8 \%$; $237 \pm 2.1 g$), que continuó hasta el día 7 del experimento (control = $100 \pm 1.8 \%$; $240 \pm 4.3 g$, AX = $75 \pm 1.6 \%$; RA = $82 \pm 0.9 \%$; $p<0.001$ RA vs. control, $p<0.0001$ AX vs. control). El peso del grupo AX también disminuyó desde el día 2 en comparación a RA ($p<0.01$). Dicha disminución se acentuó hasta el día 7 ($p<0.05$). (Figura 1)

Figura 2. Consumo de alimento.

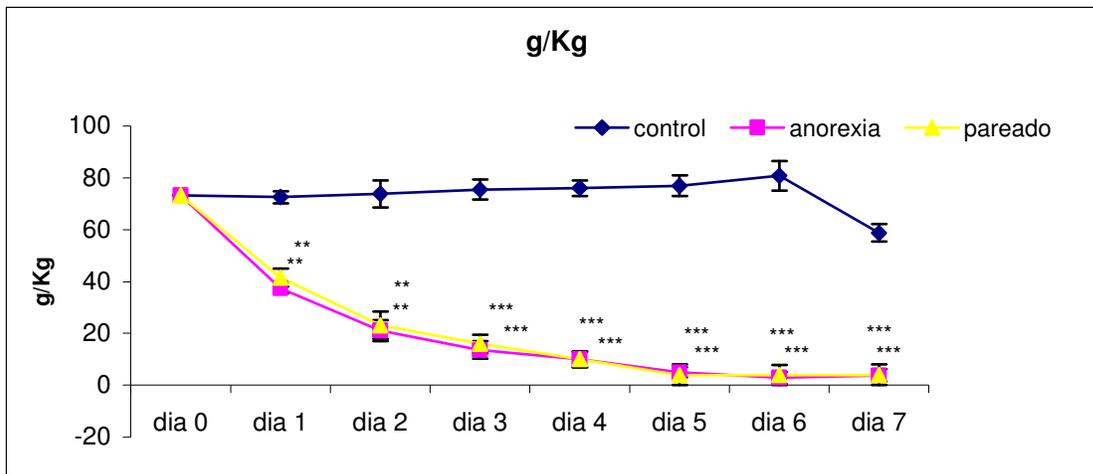


Consumo de alimento durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en hembras. Los valores están expresados como porcentaje de diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de gramos \pm EEM, $17 \pm 0.5g$). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: **** $p < 0.0001$.

El grupo AX ($48 \pm 3 \%$) y el de RA ($54 \pm 5 \%$) presentaron una disminución en su consumo de alimento desde el día 1 vs el consumo del grupo control ($100 \pm 3 \%$; $17 \pm 0.5 g$). Dicha diferencia se mantuvo hasta el día 7 (control = $100 \pm 4.04 \%$; $14 \pm 0.5g$; AX = $5 \pm 2 \%$; RA = $6 \pm 3 \%$; $p < 0.0001$). No existieron diferencias entre el grupo de AX y RA en ningún día. (Figura 2)

Figura 3. Consumo de alimento con respecto al peso corporal (g/Kg).

Con objetivo de normalizar el consumo de alimento con el peso corporal de cada grupo, se graficó el consumo de alimento en relación al peso diario de cada rata.

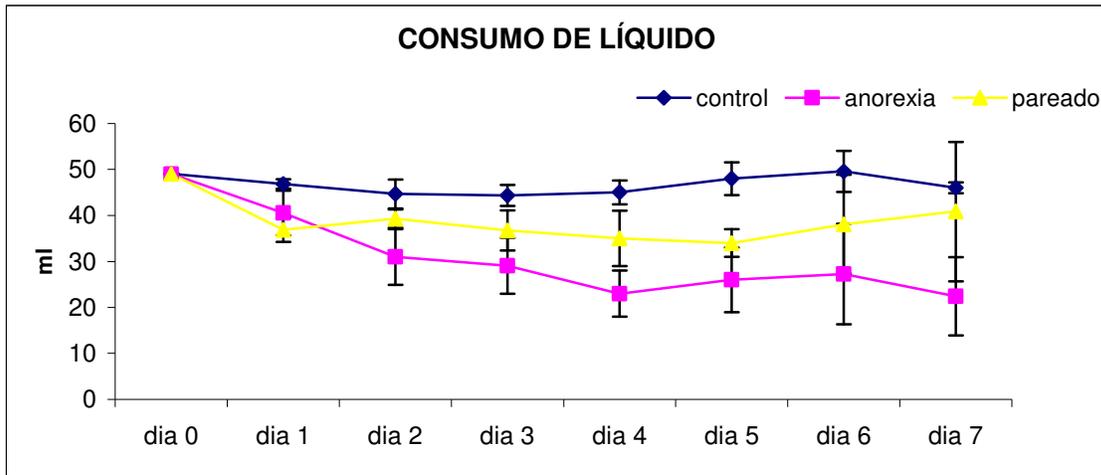


Consumo de alimento con respecto al peso durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en hembras. Los valores están expresados como un promedio del porcentaje de diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de gramos diarios de alimento \pm EEM, 73 ± 2.2 g/Kg). Análisis ANOVA de una vía, Prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.00$.

Se observó una diferencia significativa ($p < 0.01$) desde el día 1 entre el grupo AX (52 ± 3.09 %) y el grupo RA (57 ± 4.8 %) con respecto al control (100 ± 3.2 %; 72.5 ± 2.3 g/Kg). Esta disminución se acentuó hasta el día 7 (control = 100 ± 6 %; 59 ± 3 g/Kg; AX = 6.4 ± 4 %; RA = 6.7 ± 6.7 %).

No hubieron diferencias significativas entre el grupo RA y AX en ninguna etapa de la cinética (Figura 3).

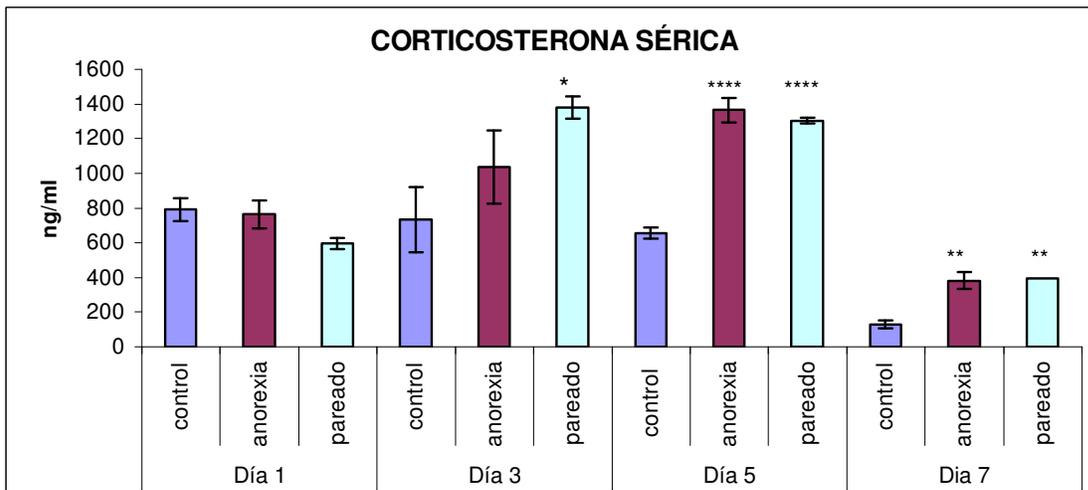
Figura 4. Consumo de líquido



Consumo de líquido durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en hembras ($n=30$). Se registró diariamente la cantidad de líquido consumido. Los valores están expresados como un promedio del porcentaje de diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de ml de agua \pm EEM, 47 ± 0.7 ml). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p<0.05$.

No existieron diferencias significativas entre los grupos en el caso del consumo de líquido (Figura 4).

Figura 5. Corticosterona sérica

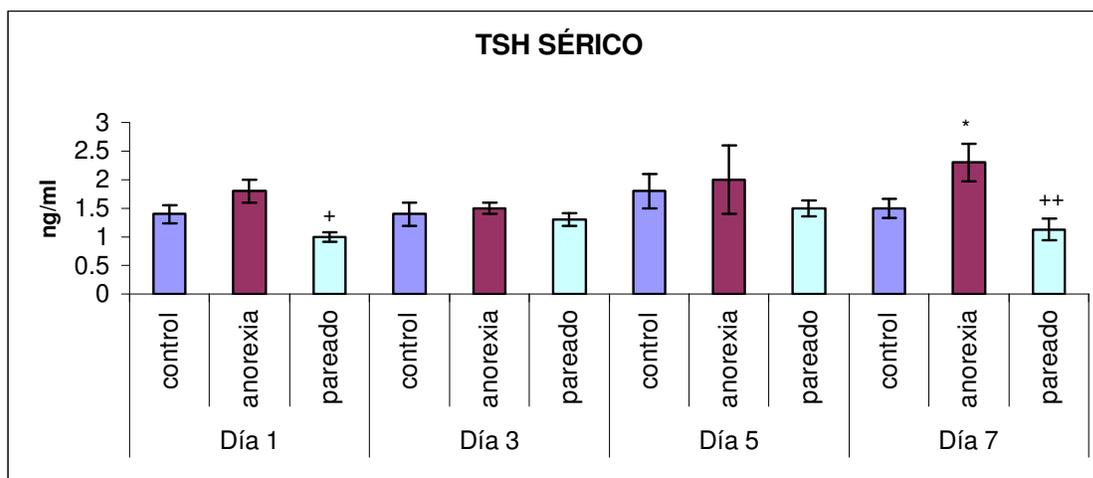


Concentración de corticosterona sérica durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras. Corticosterona sérica cuantificada por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/ml. Valores control: día 1= 790 ± 8.7 ng/ml; día 3= 732 ± 31.5 ng/ml; día 5= 658 ± 63.4 ng/ml; día 7= 130 ± 15.1 ng/ml). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p<0.05$. Diferencia vs control: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$.

En el día 1 no se observaron diferencias entre el control ($100 \pm 1.1 \%$; 790 ± 8.7 ng/ml), AX ($97 \pm 8.3 \%$; 764 ± 66.2 ng/ml) y RA ($75 \pm 10.3 \%$; 596 ± 81.7 ng/ml). En el día 3 el grupo RA ($189 \pm 28.8 \%$; 1381 ± 211.1 ng/ml) mostró un aumento del 89 % ($p < 0.05$) con respecto al grupo control ($100 \pm 4.3 \%$; 732 ± 31.5 ng/ml) mientras que AX, aunque aumentó ($146 \pm 31 \%$; 1036 ± 188.6 ng/ml), no presentó diferencias con ninguno de los grupos.

En el día 5 tanto AX ($207 \pm 4.9 \%$; 1364 ± 32.7 ng/ml) como RA ($198 \pm 11.1 \%$; 1303 ± 73 ng/ml) aumentaron la concentración de corticosterona cuando comparamos con el grupo control ($100 \pm 9.6 \%$; 658 ± 63.4 ng/ml). Esto también ocurrió en el día 7, en donde el aumento observado en el grupo AX ($294 \pm 22.8 \%$; 382 ± 29.7 ng/ml) con respecto al control ($100 \pm 16.4 \%$; 130 ± 15.1 ng/ml) fue de 194 % ($p < 0.01$) mientras que RA aumentó un 202 % ($302 \pm 47.9 \%$; 392 ± 62.3 ng/ml) ($p < 0.01$) también con respecto al control (Figura 5).

Figura 6. TSH sérico.



Concentración de TSH sérico durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras ($n=30$). TSH sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/ml. Valores expresados en concentración de ng/ml. Valores del control: día 1= 1.4 ± 0.2 ng/ml; día 3= 1.4 ± 0.2 ng/ml; día 5= 1.8 ± 0.3 ng/ml; día 7= 1.5 ± 0.2 ng/ml. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$

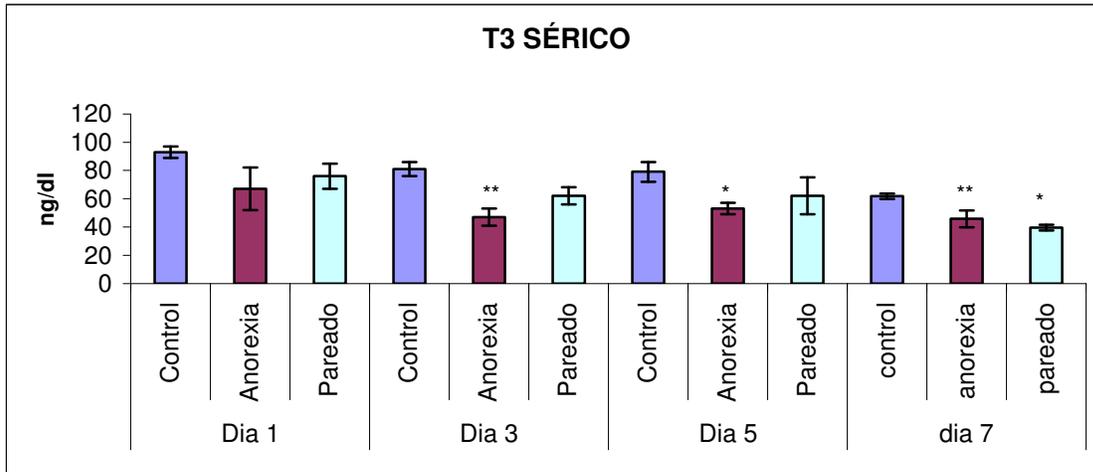
En el día 1 se observó una disminución significativa en RA ($74 \pm 6.2 \%$; 1 ± 1.08 ng/ml) de 55.2 % ($p < 0.05$) con respecto al AX ($129 \pm 0.07 \%$; 2 ± 0.2 ng/ml) mientras que ninguno fue diferente vs el control ($100 \pm 11.5 \%$; 1 ± 0.1 ng/ml).

En el día 7 el grupo AX presentó un aumento del 51% ($151 \pm 21.5 \%$) ($p < 0.05$) con respecto al control ($100 \pm 13.4 \%$; 2 ± 0.1 ng/ml), mientras que el grupo RA ($74 \pm 12.9 \%$;

1 ± 0.1 ng/ml) tuvo una disminución de 77.2 % (p<0.01) con respecto a AX. No existieron diferencias entre RA y el control. (Figura 6)

Hormonas tiroideas.

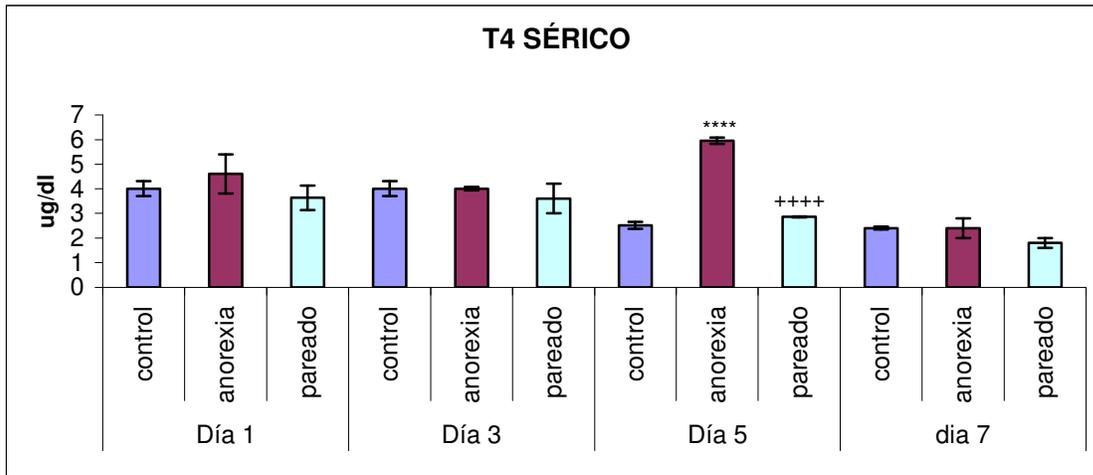
Figura 7. Contenido sérico de T3



Concentración de T3 sérico durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras (n=30). T3 sérico cuantificado por RIA. Valores del control: día 1= 93 ± 4 ng/dl; día 3= 81 ± 5 ng/dl; día 5= 79 ± 7 ng/dl; día 7= 62 ± 2 ng/dl. Los valores expresados son el promedio ± EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/dl Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando p<0,05. Diferencias vs control: *p<0.05, **p<0.01.

Las diferencias aparecieron hasta el día 3 donde hubo una disminución de 41 % (p<0.01) del grupo AX (59 ± 7.3 %; 48 ± 5.9 ng/dl) contra el grupo control (100±9.6 %; 81 ± 5.1 ng/dl), mientras que el grupo RA (77 ± 7.5 %; 62 ± 6.1 ng/dl) no presentó diferencias contra ningún grupo. Esto mismo se observó en el día 5; AX tuvo valores menores (64 ± 6 %; 53 ± 4.4 ng/dl) al comparar contra el control (100 ± 8.5 %; 80 ± 6.8 ng/dl) (p<0.05), mientras que el grupo RA (77 ± 16.3 %; 62 ± 13 ng/dl) continuó sin presentar diferencias. En el día 7, la disminución significativa de AX (64 ± 3.2 %; 40 ± 2.02 ng/dl) con respecto al control (100 ± 3.7 %; 62 ± 2.3 ng/dl) se mantuvo en un porcentaje de 36 % (p<0.01) y además se observó una disminución de 26 % (p<0.01) de RA (74 ± 9 %; 45.7 ± 5.6 ng/dl) con respecto al control (Figura 7).

Figura 8. Contenido sérico de T4.

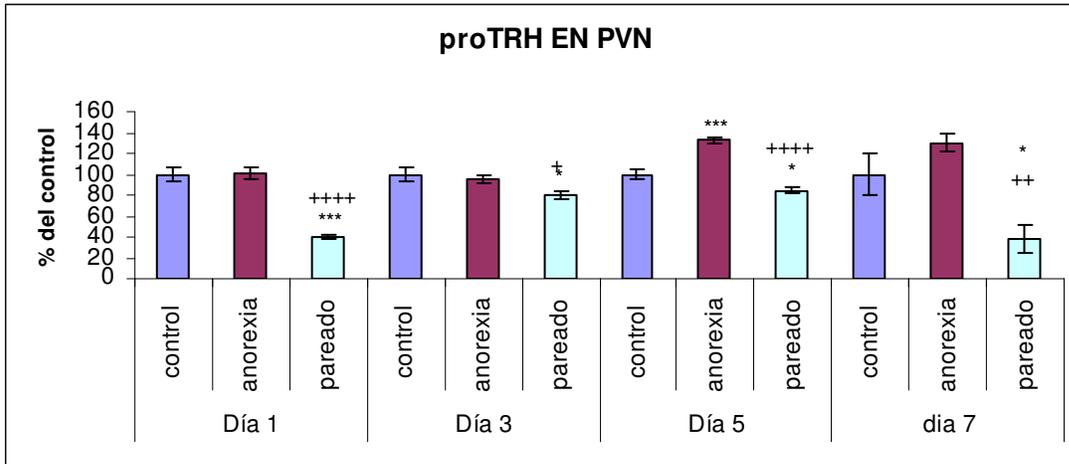


Concentración de T4 sérico durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras (n=30). T4 sérico cuantificado por RIA. Los valores expresados son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ug/dl. Valores del control: día 1= 4 ± 0.3 ug/dl; día 3= 4 ± 0.3 ug/dl; día 5= 2.5 ± 0.1 ug/dl; día 7= 2.4 ± 0.1 ug/dl. Valor crudo del control Análisis ANOVA, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: **** $p < 0.0001$; diferencias vs AX: +++++ $p < 0.0001$.

En el caso de la hormona tiroidea T4, en el día 5 el grupo de AX (237 ± 5.4 %; 6 ± 0.1 ug/dl) presentó un aumento significativo de 137 % ($p < 0.0001$) al compararlo contra el control (100 ± 5.7 %; 3 ± 0.1 ug/dl), mientras que RA (113 ± 0.6 %; 3 ± 0.02 μ g/dl) tuvo una disminución de 123 % ($p < 0.0001$) en comparación con AX, pero no presentó diferencias con respecto al control.

En el día 7, no se observaron diferencias entre ninguno de los grupos experimentales (control = 100 ± 2.5 %; 2 ± 0.06 ug/dl; AX= 99 ± 6.2 %; 2 ± 0.4 ug/dl, RA = 76 ± 9.4 %; 2 ± 0.2 ug/dl) (**Figura 8**).

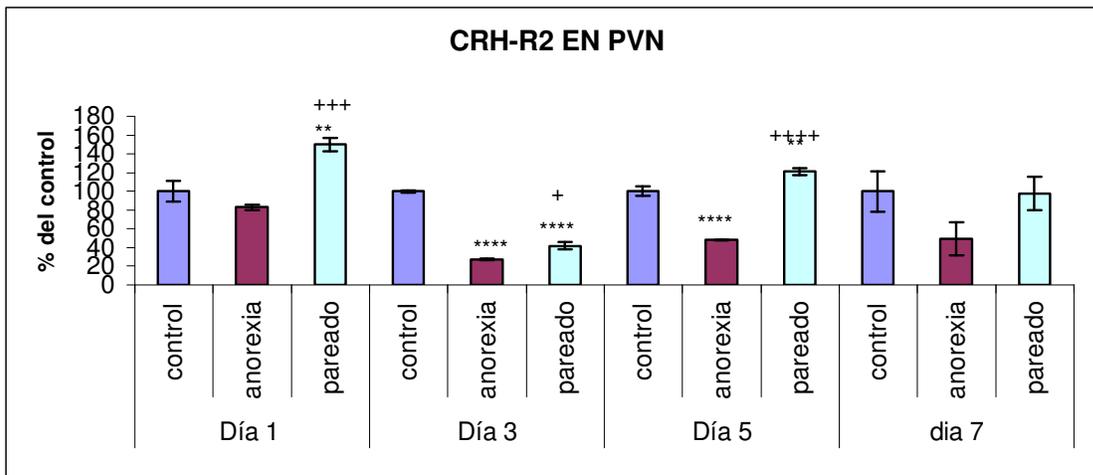
Figura 9. Expresión del gen proTRH en el Núcleo Paraventricular (NPV) del Hipotálamo.



Expresión de proTRH en el NPV durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras (n=30). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a TRH/ciclofilina \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$, +++ $p < 0.01$, +++++ $p < 0.0001$.

En todos los días del experimento, se encontraron disminuciones entre RA y el control que fueron de: día 1, 60 % (control = 100 \pm 7.2%; RA = 40 \pm 1%); día 3, 20 % (control = 100 \pm 7; RA = 80 \pm 2.1); día 5, 16 % (control = 100 \pm 3.5 %; RA = 85 \pm 2.8 %); día 7, 62 % (control = 100 \pm 20.2 %; RA = 38 \pm 13.5 %). El grupo de AX nunca fue diferente del control, con excepción del día 5, en donde AX (133 \pm 3 %) tuvo valores aumentados con respecto al control (100 \pm 4 %). Por otro lado, AX siempre fue diferente a RA. (**Figura 9**)

Figura 10. Expresión del gen CRH-R2 en el NPV



Expresión de CRH-R2 en el NPV durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras (n=30). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Valores obtenidos son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a CRH-R2/ciclofilina \pm EMM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$, +++ $p < 0.001$, ++++ $p < 0.0001$.

La expresión de CRH-R2 cambió diferencialmente entre AX y RA los días 1, 3 y 5.

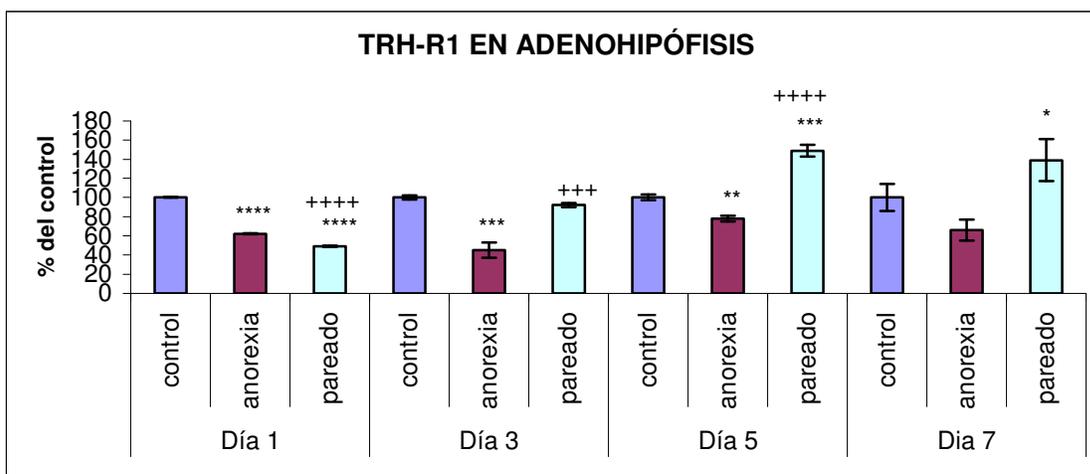
En el día 1 de la cinética hubo un aumento de 50% del RA con respecto al control (100 \pm 10.8%) y vs el grupo AX.

Desde el día 3, AX presentó una disminución de 73 % (28 \pm 0.6%) con respecto al control (100 \pm 1.3 %) y vs RA que también disminuyó al compararlo vs el control (42 \pm 4 %).

En el día 5 el grupo AX (48 \pm 0.5) mantuvo la disminución con respecto al control (100 \pm 4.8 %) de 52 %, mientras que RA (121 \pm 4.8 %) aumentó 21 % con vs el control y AX

(Figura 10).

Figura 11. Expresión del gen de TRH-R1 en la adenohipófisis.



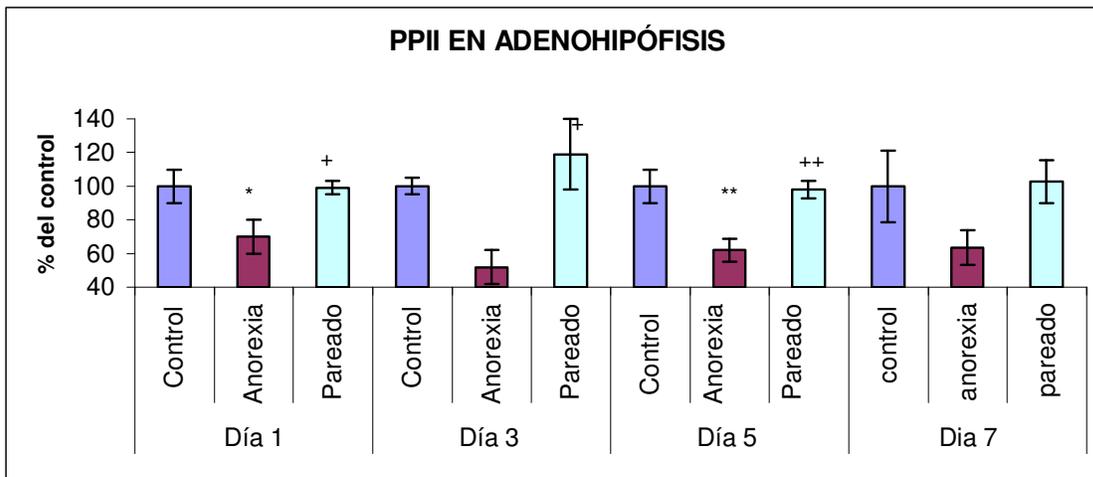
Expresión de TRH-R1 durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras (n=30). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Valores obtenidos son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a TRH-R1/ciclofilina \pm EMM expresados en % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; diferencias con AX: +++ $p < 0.001$, +++++ $p < 0.0001$.

Puesto que la expresión del receptor TRH-R1 es un factor más de regulación del funcionamiento del eje tiroideo, se midió en adenohipófisis por RT-PCR.

Desde el día uno se observó que una disminución en el grupo AX (61.9 ± 0.4 %) de un 38% con respecto al control (100 ± 0.3 %) al igual que en RA (49 ± 0.5 %) donde hubo una disminución de 51 %. En el día 3, AX (45 ± 8.4 %) disminuyó con respecto al control 55 % (100 ± 2.6 %) y también con respecto a RA (92 ± 2 %). En el día 5, RA (149 ± 5.8 %) aumentó 71% vs AX (78 ± 2.6 %) y 50 % vs el control (100 ± 3.09 %). AX disminuyó 22 % vs control.

En el día 7, RA aumentó significativamente 39 % con respecto al control (**Figura 11**).

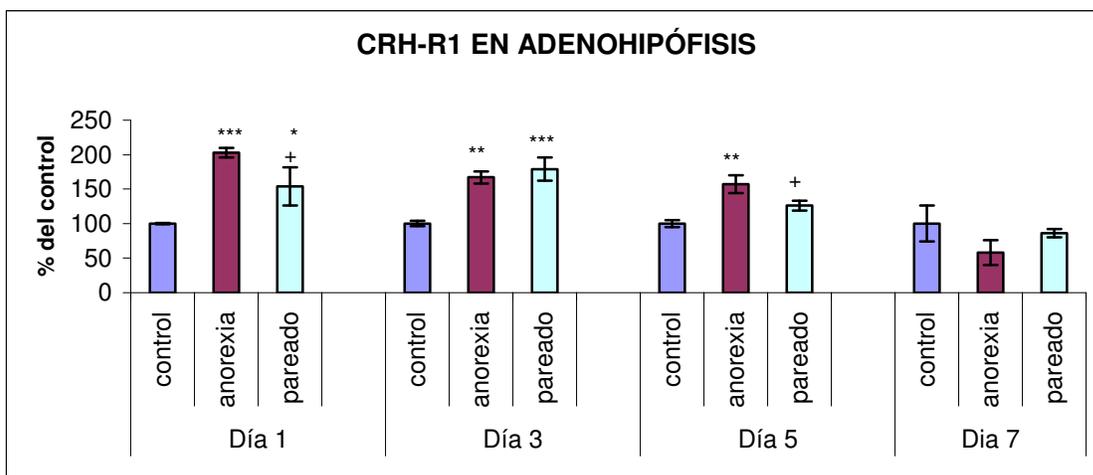
Figura 12. Expresión del gen de la PPII en la adenohipófisis.



Expresión de PPII en la adenohipofisis durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras ($n=30$). Dicha expresión fue semi-cuantificada por RT-PCR. Valores obtenidos son el promedio del cociente de la densidad de bandas correspondiente a PPII/ciclofilina \pm EMM y expresados como % del control (control = $100\% \pm$ EEM). Análisis ANOVA de una vía, Prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$

En el día 1, la expresión de PPII en el grupo de AX ($70 \pm 10.3\%$) disminuyó en un 30 % con respecto al grupo control ($100 \pm 10\%$) y de 29 % con respecto a RA ($99 \pm 4.01\%$). En el día 3, el RA ($120 \pm 21.6\%$) presentó un aumento con respecto a AX ($53 \pm 10.1\%$). El valor del control fue: $100 \pm 5.08\%$. En el día 5 AX ($62 \pm 6.8\%$) la expresión de PPII disminuyó un 38 % con respecto al control ($100 \pm 9.6\%$) y un 37 % con respecto a RA ($98 \pm 5.1\%$) (**Figura 12**).

Figura 13. Expresión del gen de CRH-R1 en la adenohipófisis.

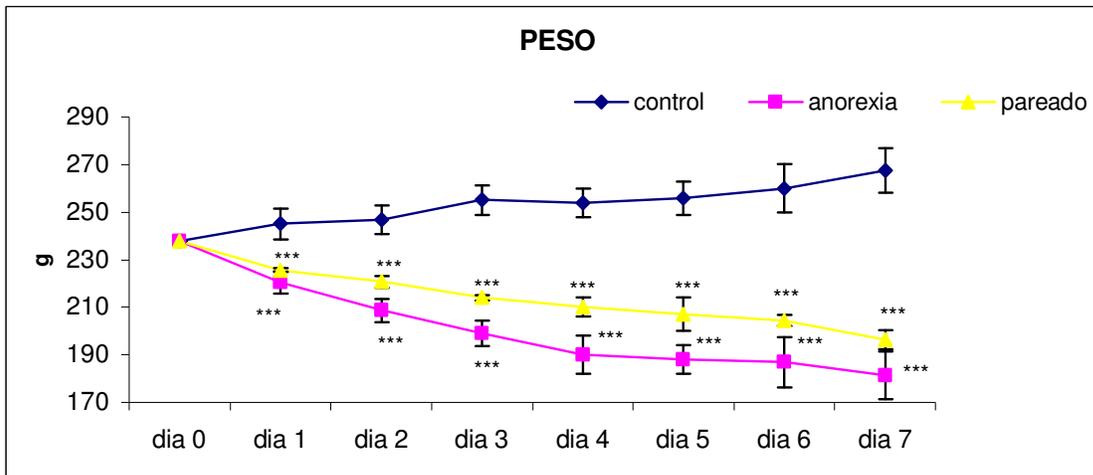


Expresión de CRH-R1 en la adenohipofisis durante los días sometidos a estrés por deshidratación en hembras (n=30). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Valores obtenidos son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a CRH-R1/G3PDH \pm EMM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$.

Aunque el contenido del RNAM de CRH-R1 aumentó en los días 1-5 en ambos grupos experimentales vs el control, no se presentó diferencia entre ellos. La expresión de CRH-R1 en el día 1 aumentó en AX (203 \pm 7.1 %) con respecto al control (100 \pm 1.1 %) y RA (154 \pm 27.6 %). Por su parte, RA también presentó un aumento de 54 % con respecto al grupo control. Este aumento se mantuvo en el día 3, en el cual AX (167 \pm 9.9 %) presentó un aumento de 67 % con respecto al control (100 \pm 4.9 %) y vs RA (180 \pm 17 %). El aumento se mantuvo en el día 5 para AX (158 \pm 12.8 %), que sobrepasó el valor del control (100 \pm 4.9 %) con 58 %, mientras que RA (127 \pm 6.9 %) no presentó diferencias con el control pero si con AX (Figura 13).

7.2 Cinética de cambios durante 7 días de estrés por deshidratación en machos.

Figura 14. Peso.

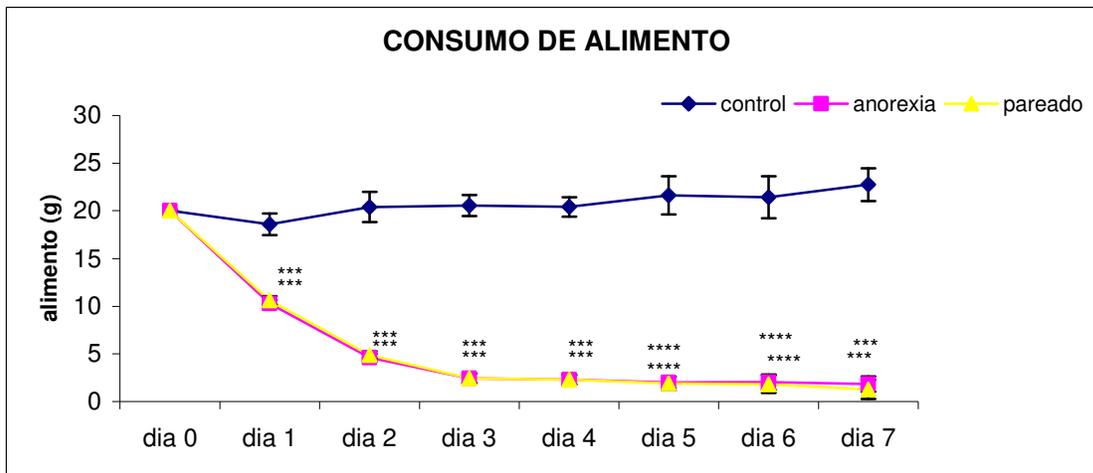


Cambios en el peso corporal durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en machos (n = 30). Las ratas se pesaron diariamente del día 0 al día 7. Los valores están expresados en promedio de porcentaje de la diferencia con respecto al grupo control (c = 100%; promedio de g de alimento \pm EEM, 253 \pm 3.2 g). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; diferencias vs AX: ++ $p < 0.01$, + $p < 0.05$.

El peso corporal disminuyó en AX y RA con respecto al control desde el día 1 (control = 100 \pm 2.6 %; 245 \pm 2.5g, AX = 90 \pm 1.9 %; 221 \pm 4.6g, RA = 92 \pm 0.3%; 226 \pm 0.8 g; $p < 0.001$) hasta el día 7 del experimento (control = 100 \pm 3.4 %; 267 \pm 9.3 g; AX = 68 \pm 3.7

%; 181 ± 10.06 g, RA = $73 \pm 1.5\%$; 196 ± 4.1 g; $p < 0.01$). No hubo diferencias entre RA y AX en ninguna etapa de la cinética (**Figura 14**).

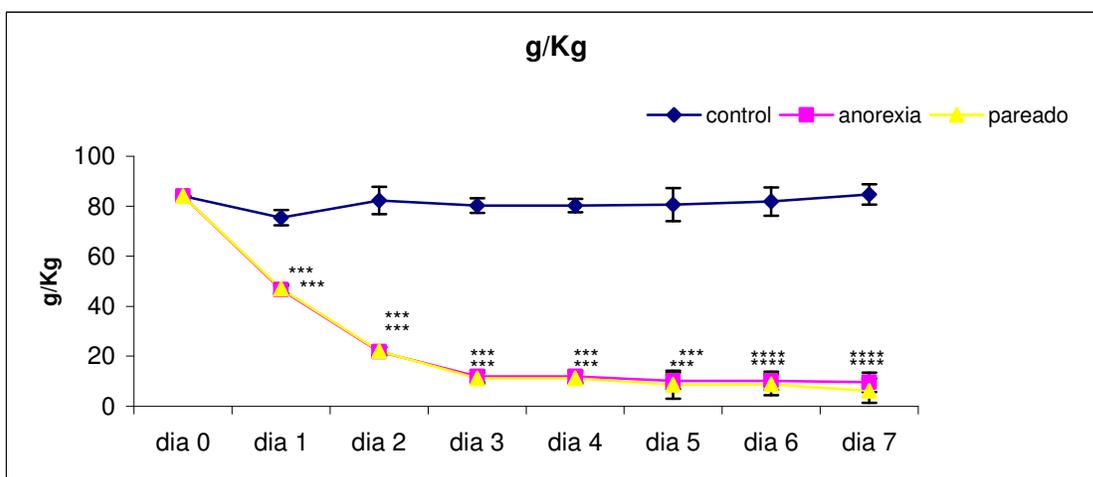
Figura 15. Consumo de alimento



Consumo de alimento durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en machos. Los valores expresados en promedio de porcentaje de diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de gramos \pm EEM, 21 ± 0.4 g). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Se observaron disminuciones del grupo AX y RA con respecto al control desde el día 1 (control = $100 \pm 6.09\%$; 19 ± 1.1 g, AX = $55 \pm 2.1\%$; RA = $57 \pm 2.3\%$; $p < 0.001$) que se mantuvieron hasta el día 7 (control = $100 \pm 7.6\%$; 23 ± 1.7 g, AX = $8 \pm 3.5\%$; RA = $5 \pm 4.3\%$; $p < 0.001$) (**Figura 15**).

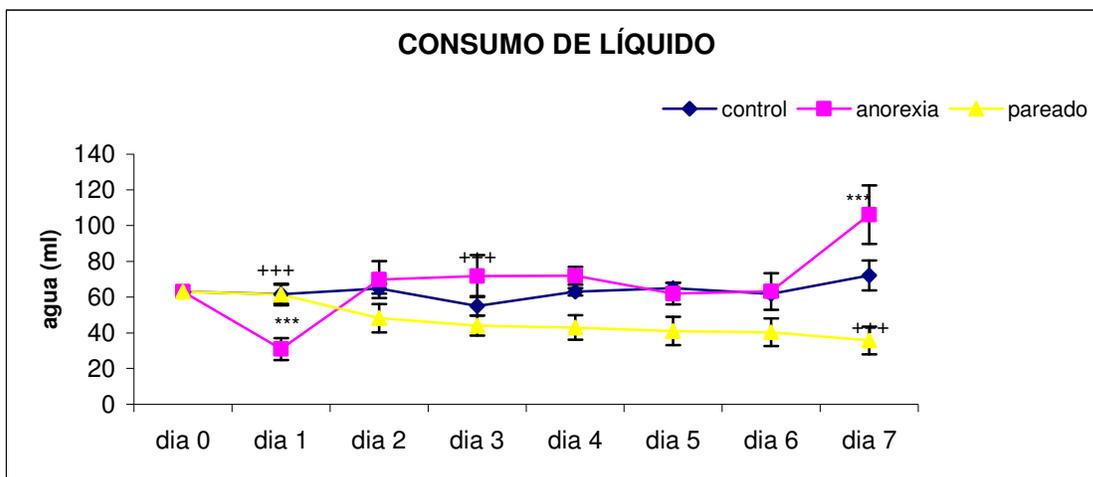
Figura 16. Consumo de alimento con respecto al peso (g/kg)



Consumo de alimento con respecto al peso durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en machos (n= 30). Se registró diariamente la cantidad de alimento consumido por las ratas del día 0 al día 7, así como el peso corporal. Los valores están expresados en promedio de porcentaje de diferencia con respecto al grupo control (c=100%; promedio de g/Kg \pm EEM, 81 \pm 1 g/Kg). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

El consumo de alimento con respecto al peso en la cinética de machos disminuyó ($p < 0.001$) con respecto al control (100 ± 4.03 %; 75 ± 3.04 g/Kg) en RA (62 ± 2.4 %) y AX (69 ± 2.1 %), que se mantuvo hasta el día 7 (control = 100 ± 4.8 %; 85 ± 4.07 g/Kg; AX = 11 ± 4.5 %; RA = 7 ± 5.6 %; $p < 0.0001$) (Figura 16).

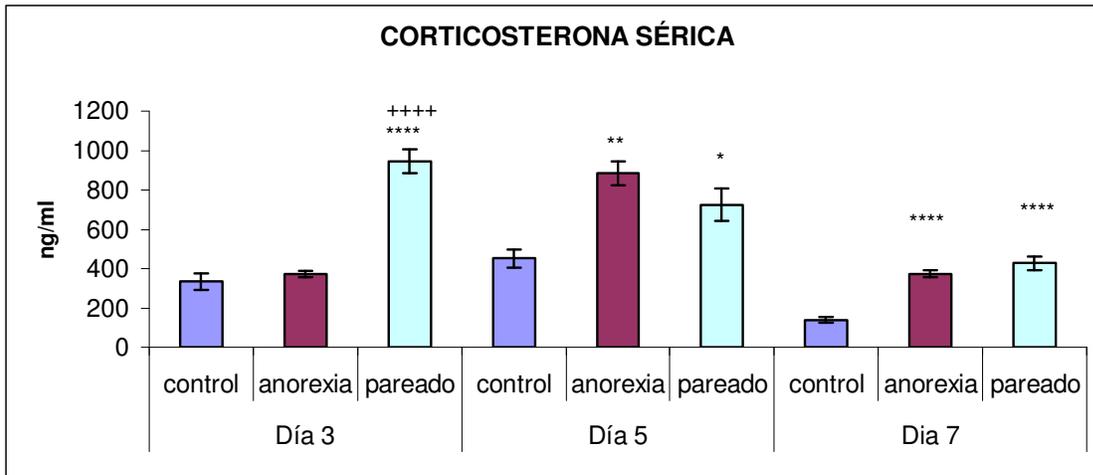
Figura 17. Consumo de líquido



Consumo de líquido (agua o solución salina al 2.5%) durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en machos. Los valores están expresados en promedio del porcentaje de la diferencia con respecto al grupo control (c=100%; promedio de ml \pm EEM, 63 \pm 1.6 ml). Análisis ANOVA una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: *** $p < 0.001$; diferencias vs AX:+++ $p < 0.001$.

En el día 1, el consumo de líquido del grupo AX tuvo un comportamiento irregular, disminuyendo (50 ± 10 %) con respecto al control (100 ± 8.5 %; 62 ± 5.2 ml) y contra el grupo RA (100 ± 9.9 %), mientras que el control y RA se comportaron de manera similar. En el día 3, el consumo de RA (80 ± 10.1 %) disminuyó ($p < 0.001$) con respecto a AX (130 ± 21.3 %) pero no con respecto al control (100 ± 9.8 ; 55 ± 5.4 ml). En el día 7 AX (147 ± 22.6 %) se aumentó ($p < 0.001$) con respecto al control (100 ± 11.6 %; 72 ± 8.3 ml) y con respecto a RA (50 ± 10.8 ; $p < 0.001$) (Figura 17).

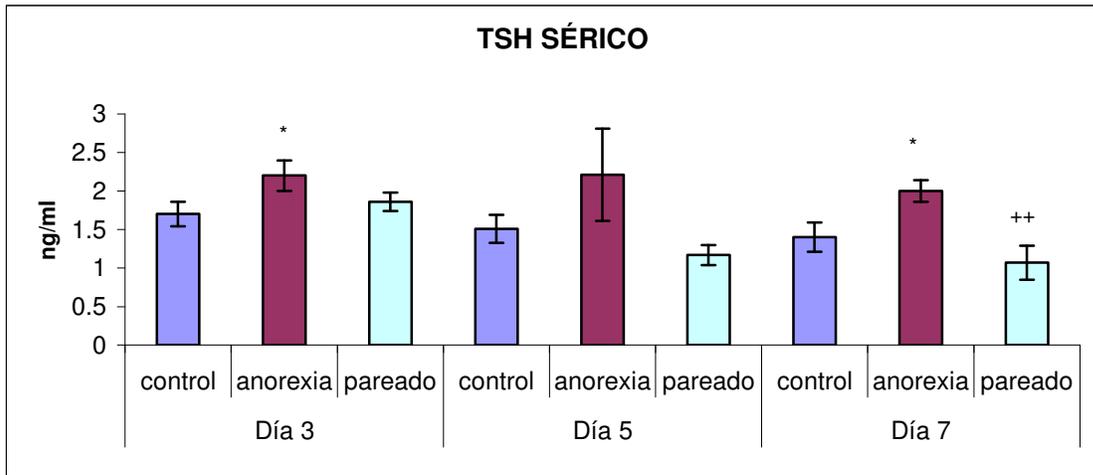
Figura 18. Corticosterona sérica



Concentración de corticosterona sérica durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n=30$). Corticosterona sérica cuantificada por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/ml. Valores del control: día 3= 334 ± 42.8 ng/ml; día 5= 451 ± 45 ng/ml; día 7= 139 ± 12.7 ng/ml). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p<0.05$. Diferencias vs control: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.0001$; diferencias vs AX: **** $p<0.0001$.

Un tercio del total del grupo de machos se sacrificaron en el día 3, 5, y 7 debido a que el número de animales fue menor ($n=30$; $n_{AX}=4$; $n_{RA}=3$; $n_{control}=3$). En el día 3 RA ($283 \pm 18.3\%$; 945.5 ± 61.1 ng/ml) aumentó la concentración de su corticosterona sérica en un 183% ($p<0.0001$) con respecto al control ($100 \pm 12.8\%$; 334 ± 42.8 ng/ml) y un 172% ($p<0.0001$) con respecto a la AX ($111 \pm 4.5\%$; 372 ± 15.1 ng/ml). El grupo RA ($160.6 \pm 18.1\%$; 725 ± 82 ng/ml) siguió manteniendo un aumento con respecto al control ($100 \pm 10\%$; 451 ± 45 ng/ml) en el día 5 (61%, $p<0.05$), mientras que AX ($196 \pm 13.6\%$; 884 ± 62 ng/ml) aumentó vs el control en 95.9%. En el día 7 AX ($268 \pm 13.4\%$; 373 ± 18.7 ng/ml) y RA ($306 \pm 24.2\%$; 427 ± 33.8 ng/ml) presentaron aumentos vs el control ($100 \pm 9.1\%$; 139 ± 12.7 ng/ml) de 168% ($p<0.0001$) y de 206% ($p<0.0001$), respectivamente (**Figura 18**).

Figura 19. TSH sérico

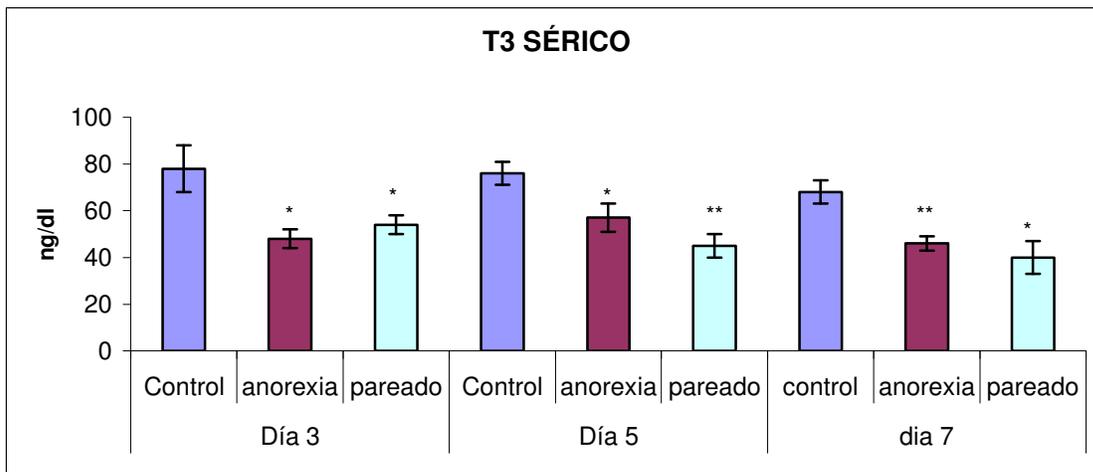


Concentración de TSH sérico durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n=30$). TSH sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/ml. Valores del control: día 3= 2 ± 0.1 ng/ml; día 5= 1.5 ± 0.2 ng/ml; día 7= 1 ± 0.1 ng/ml. Análisis ANOVA de una vía. Prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$; diferencias vs AX: ++ $p < 0.01$.

En el día 3, el grupo AX (130 ± 11.8 %; 2 ± 0.2 ng/ml) aumentó 31 % ($p < 0.05$) vs el control (100 ± 9.6 %; 2 ± 0.1 ng/ml), pero no con respecto a RA (109 ± 6.9 %; 2 ± 0.1 ng/ml). En el día 7 AX (145 ± 10.2 %; 2 ± 0.1 ng/ml) presentó un aumento con respecto al control (100 ± 13.5 %; 1 ± 0.1 ng/ml) de 45 % ($p < 0.05$), mientras que RA (74 ± 15.8 %; 1 ± 0.2 ng/ml) disminuyó vs AX (71 %, $p < 0.01$) pero no con respecto al control (**Figura 19**).

Hormonas tiroideas

Figura 20. Contenido sérico de T3



Concentración de T3 sérico durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n= 30$). T3 sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada

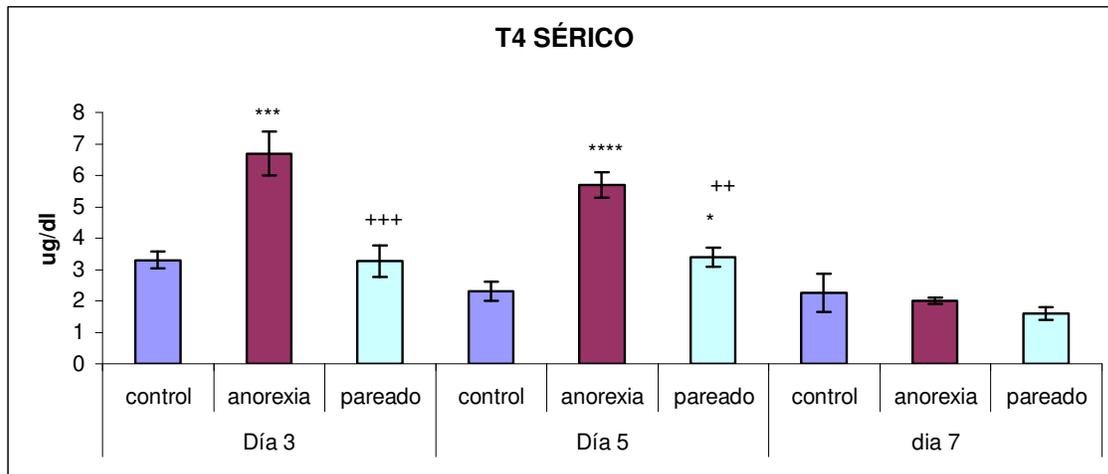
en ng/dl. Valores del control: día 3= 78 ± 10.3 ng/dl; día 5= 76 ± 4.8 ng/dl, día 7= 67 ± 5.1 ng/dl. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

En el caso de la hormona sérica T3 el día 3, tanto RA (70 ± 5.1 %; 54 ± 4.01 ng/dl) como AX (62 ± 5.1 %; 48 ± 3.9 ng/dl) se observaron disminuidos significativamente con respecto al control (100 ± 13.2 %; 78 ± 10.3 ng/dl), con valores de 38 % ($p < 0.05$) y de 30 % ($p < 0.05$), respectivamente. No hubieron diferencias significativas entre RA y AX.

Esta disminución de la concentración de T3 sérico en AX y RA se mantuvo en el día 5, en donde AX (75 ± 7.9 %; 57 ± 6.01 ng/dl) difirió del control (100 ± 6.4 %; 76 ± 4.8 ng/dl) en 25% ($p < 0.05$) y RA (60 ± 6.5 %; 45 ± 4.9 ng/dl) en 40 % ($p < 0.01$). No se observaron diferencias significativas entre RA y AX.

En el día 7, los cambios observados se mantuvieron. AX (60 ± 10.2 %; 40 ± 6.9 ng/dl) disminuyó un 41 % ($p < 0.01$) vs el control (100 ± 7.6 %; 67 ± 5.1 ng/dl), mientras que RA (69 ± 5.7 %; 46 ± 3.8 ng/dl) disminuyó un 31 % ($p < 0.05$) también en comparación con el control (Figura 20).

Figura 21. Contenido sérico de T4

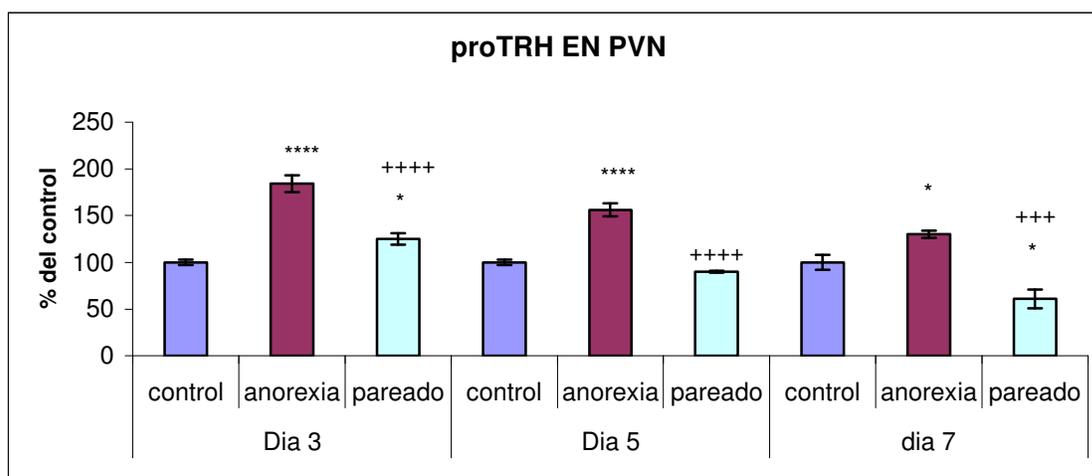


Concentración de T4 sérico durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos (n=30). T4 sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ug/dl. Valores del control: día 3= 3 ± 0.2 ug/dl; día 5= 2 ± 0.2 ug/dl; día 7= 1 ± 0.2 ug/dl. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

En el caso de la hormona tiroidea T4, los valores de la concentración sérica en el día 3 en AX (203 ± 21.4 %; 7 ± 0.7 ug/dl) se observaron aumentados un 103 % ($p < 0.001$) vs el control (100 ± 7.9 %; 3 ± 0.2 ug/dl) y en 104% ($p < 0.001$) vs RA (99 ± 15.5 %; 3 ± 0.5 ug/dl). En el día 5, AX (243 ± 18.6 %; 6 ± 0.4 ug/dl) se mantuvo aumentada vs el control

(100 ± 11.7 %; 2 ± 0.2 ug/dl) en 143 % ($p < 0.0001$) y vs RA (147 ± 13.2 %; 3 ± 0.3 ug/dl) en 97 % ($p < 0.01$). RA presentó a su vez un aumento de 47 % ($p < 0.05$) con respecto al control. En el día 7 AX (91 ± 4.8 %; 2 ± 0.1 ug/dl) no presentó diferencias significativas con respecto al control (100 ± 27.4 %; 2.25 ± 0.6 ug/dl); RA (145 ± 16.7 %; 2 ± 0.1 ug/dl) tampoco mostró diferencias con respecto al control o AX. (Figura 21)

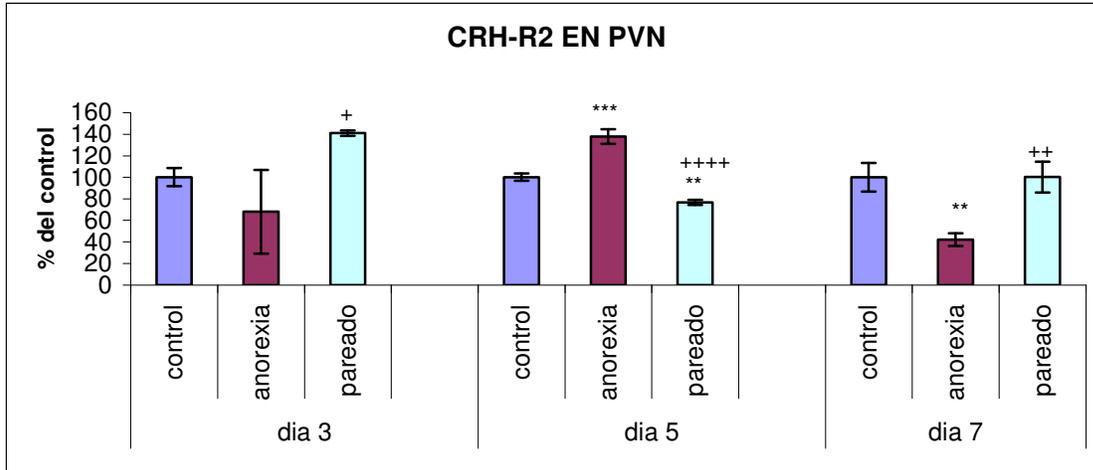
Figura 22. Expresión del gen proTRH en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo.



Expresión de proTRH en el NPV durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n=30$). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a TRH/ciclofilina \pm EEM y expresada como el % del control (control = $100\% \pm$ EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$; diferencias vs AX: +++ $p < 0.001$, ++++ $p < 0.0001$.

La expresión de TRH en el NPV de machos AX aumentó (184 ± 8.6 %) 84 % ($p < 0.0001$) vs el grupo control (100 ± 2.6 %) y 59 % ($p < 0.0001$) con respecto a RA (125 ± 6.2 %). El RA también aumentó un 25 % ($p < 0.05$) con respecto al control. En el día 5, la concentración de RNAM de proTRH en AX (156 ± 7.03 %) mantuvo su aumento con valores de 56 % ($p < 0.0001$) con respecto al control (100 ± 2.8 %). El RA ($90 \pm 1\%$) no cambió con respecto al control, pero disminuyó con respecto a AX en 66 % ($p < 0.0001$). El día 7 mostró que la síntesis de TRH en AX (130 ± 4.06 %) siguió siendo más elevada (30 %; $p < 0.05$) con respecto al control (100 ± 8.4 %), mientras que en RA (61 ± 9.5 %) disminuyó con respecto al control 39% ($p < 0.05$) y también con respecto a AX en 69 % ($p < 0.001$) (Figura 22).

Figura 23. Expresión del gen de CRH-R2 en el NPV



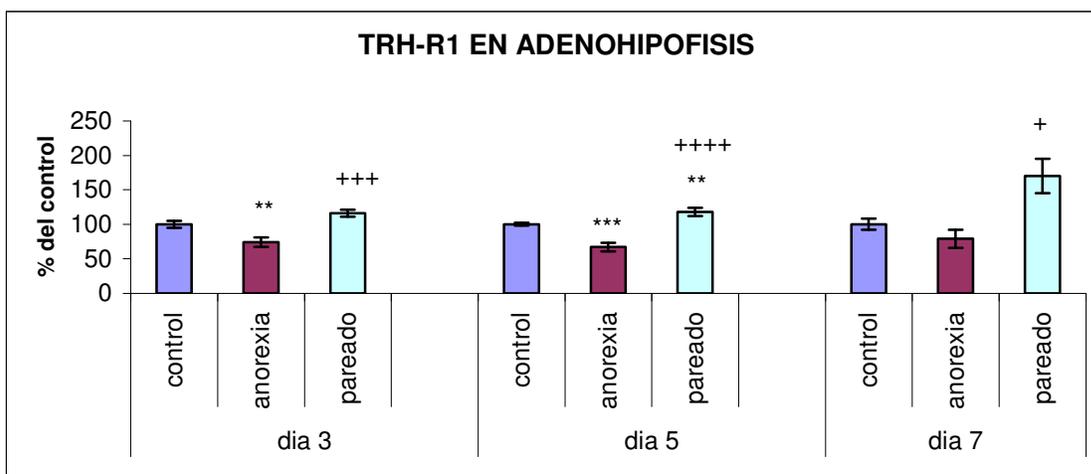
Expresión de CRH-R2 en el NPV durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n=30$). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio de el cociente de la densidad de la banda correspondiente a CRH-R2/ciclofilina y expresados como el % del control (control = $100\% \pm EEM$). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$, ++++ $p < 0.0001$.

La expresión del receptor CRH-R2 en la cinética de machos aumentó un 74 % ($p < 0.05$) RA en comparación con la del grupo AX.

En el día 5, AX ($138 \pm 2.3\%$) aumentó un 38 % ($p < 0.001$) vs el control ($100 \pm 3.3\%$) y 62 % ($p < 0.0001$) vs RA ($77 \pm 6.8\%$), que también disminuyó un 23 % ($p < 0.01$) con respecto al control.

En el día 7, AX ($42 \pm 5.9\%$) volvió a disminuir (58 %, $p < 0.01$) con respecto al control ($100 \pm 13.3\%$) y también (58 %, $p < 0.01$) con respecto a RA ($100 \pm 14.4\%$), el cual no mantuvo diferencias con respecto al control (**Figura 23**).

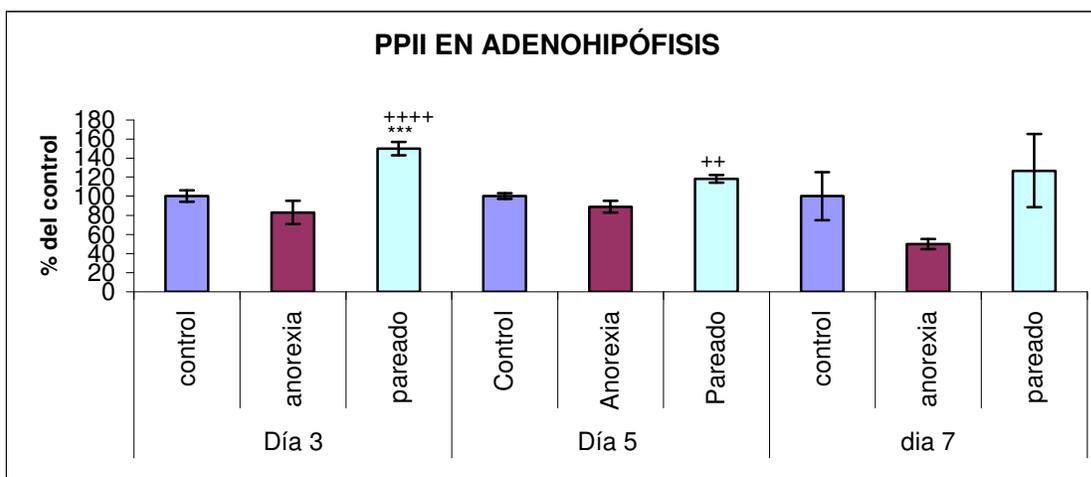
Figura 24. Expresión de TRH-R1 en la adenohipofisis



Expresión de TRH-R1 durante la cinética de cambios por 7 días bajo estrés por deshidratación en machos ($n=30$). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a TRH-R1/ciclofilina \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; diferencias vs AX: + $p < 0.05$.

La expresión del receptor en el día 3 disminuyó (26 %, $p < 0.01$) en AX (74 ± 7.4 %) con respecto al control (100 ± 4.7 %) y también (43 %, $p < 0.001$) con respecto a RA (116 ± 5.4 %). En el día 5 AX (67 ± 5.5 %) continuó disminuida con respecto al control (100 ± 1.9 %) en 33 % ($p < 0.001$) y con respecto a RA (119 ± 6.03 %) en 52 % ($p < 0.01$), donde aumentó 19 % ($p < 0.0001$) con respecto al control. En el día 7 no se observaron diferencias en AX (79 ± 12.7 %) o RA (170 ± 25.2 %) con respecto al control (100 ± 17.6 %), pero AX disminuyó vs RA un 91 % ($p < 0.05$) (**Figura 24**).

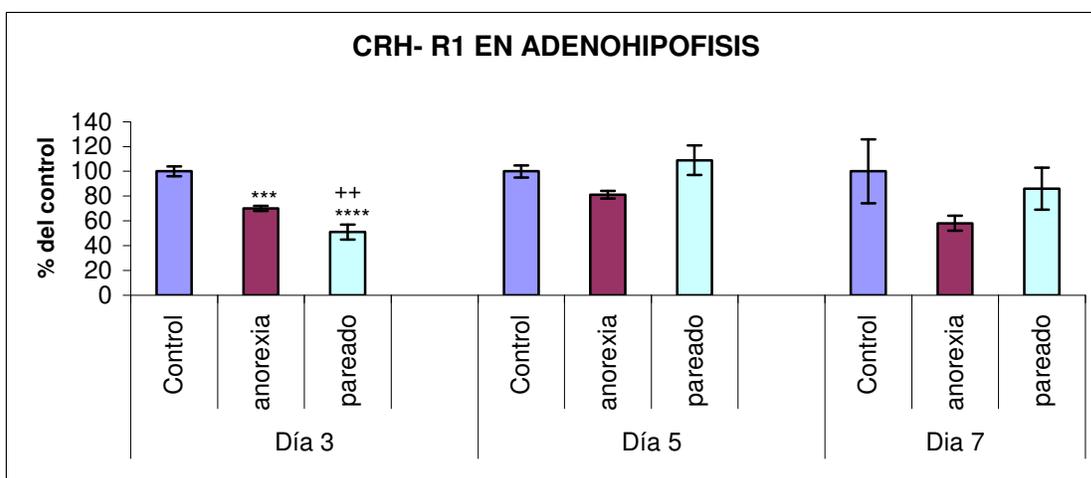
Figura 25. Expresión del gen de PPII en adenohipófisis



Expresión de PPII en la adenohipófisis durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n=30$). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocianato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a PPII/ciclofilina \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: *** $p < 0.001$; diferencias vs AX: ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.0001$

En el día 3, la expresión de PPII en la adenohipófisis del grupo RA (149 ± 7.05 %) aumentó 49 % ($p < 0.001$) con respecto al control y 67% ($p < 0.0001$) con respecto a AX. En el día 5 el grupo RA aumentó 29 % ($p < 0.01$) vs AX (**Figura 25**).

Figura 26. Expresión del gen de CRH-R1 en adenohipofisis



Expresión de CRH-R1 en la adenohipófisis durante los días sometidos a estrés por deshidratación en machos ($n=30$). Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocianato de guanidina, seguida de RT-PCR. Valores obtenidos son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a CRH-R1/G3PDH \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias vs control: *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$; diferencias vs AX: ++ $p < 0.01$.

La expresión de CRH-R1 en machos mostró diferencias en el día 3, donde AX ($70 \pm 2 \%$) difirió del control ($100 \pm 4 \%$) ($p < 0.001$), así como RA ($51 \pm 6 \%$; $p < 0.0001$). RA y AX también fueron diferentes el día 3 ($p < 0.01$) (**Figura 26**).

7.3 Comparación de cinéticas entre géneros

A excepción de pequeñas diferencias transitorias ocurridas en algunos parámetros, se observó que en el día 7, los valores comparados de machos y hembras no muestran diferencias significativas en ningún grupo experimental. Esto demuestra que a pesar de que existen cambios transitorios durante las cinéticas de cada género, el metabolismo se estabiliza para el día 7 en ambos géneros, lo que da la pauta para realizar el experimento de la inyección de antagonista en el NPV durante 7 días. Además de esto, se observó que los machos mantienen en el día 7 niveles de expresión de RNAM de proTRH mayores significativamente con respecto a su control, mientras que las hembras no presentan diferencias significativas con su control ese día, lo que indica que aunque ambos géneros poseen un eje HHT activado, los machos poseen una activación más marcada, lo que da la pauta para utilizar machos en el experimento de la inyección del antagonista. A continuación, una tabla que resume las comparaciones realizadas entre géneros. Los resultados de la ANOVA se encuentran en el Anexo 3:

Variable medida	Día 3	Día 5	Día 7
Corticosterona sérica (ng/ml)	AX: *** RA: * Control: *	AX: ** RA: **** Control: *	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias
TSH sérico (ng/ml)	AX: * RA: sin diferencias Control: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias
T3 sérico (ng/dl)	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias
T4 sérico (ug/dl)	AX: ** RA: sin diferencias Control: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias Control: sin diferencias
RNAM de proTRH (% del control)	AX: **** RA: ***	AX: ** RA: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias

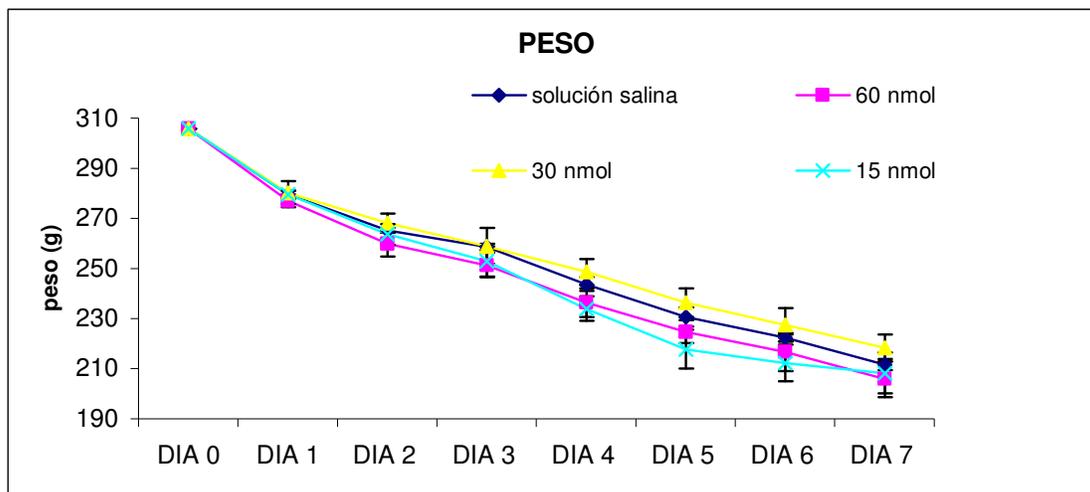
RNAM de CRH-R2 (% del control)	AX: sin diferencias RA: **	AX: **** RA: ***	AX: sin diferencias RA: sin diferencias
RNAM de TRH-R1 (% del control)	AX: * RA: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: **	AX: sin diferencias RA: sin diferencias
RNAM de CRH-R1 (% del control)	AX: **** RA: ****	AX: ** RA: sin diferencias	AX: sin diferencias RA: sin diferencias
RNAM de PPII (% del control)	AX: sin diferencias RA: sin diferencias	AX: ** RA: *	AX: sin diferencias RA: sin diferencias

Diferencias entre géneros dentro de cada grupo experimental: AX= grupo bajo estrés por deshidratación; RA= grupo bajo restricción alimentaria; control. Análisis ANOVA de 3 vías con prueba post-hoc de Fisher. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$. Diferencias significativas entre géneros: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

7.4 Inyección del antagonista Antisauvagina -30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

Jaimes (2006) ha reportó los cambios observados en ratas hembras bajo estrés por deshidratación únicamente para el día 7. Dado que no todos los cambios que se tienen reportados en el día 7 para hembras se presentaron también en días anteriores para hembras o machos en estos experimentos, se decidió inyectar el antagonista diariamente durante 7 días, sacrificando ratas macho al séptimo día.

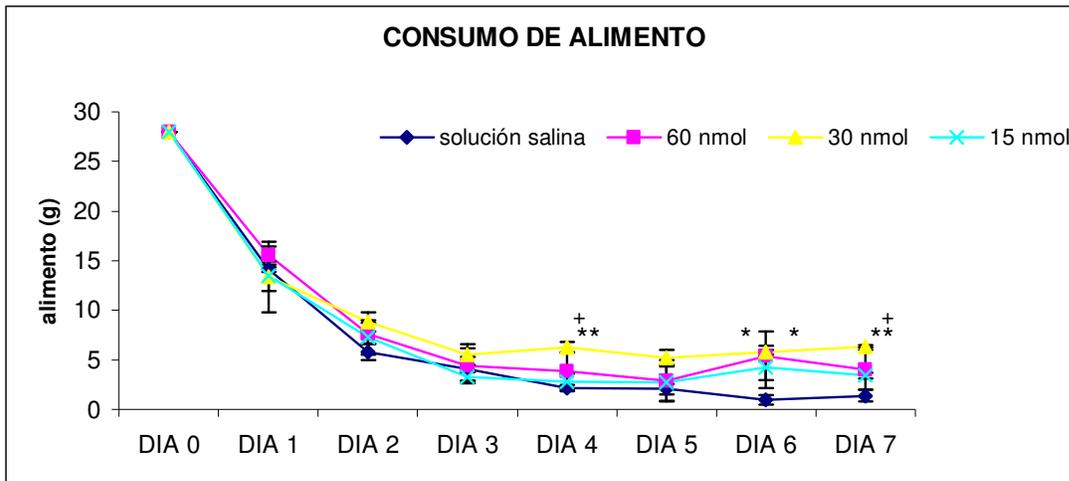
Figura 27. Peso



Cambios en el peso corporal con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo ($n=12$). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Las ratas se pesaron diariamente del día 0 al día 7. Los valores están expresados en promedio del porcentaje de la diferencia con respecto al grupo control ($c=100\%$; promedio de gramos \pm EEM, 252 ± 11 . g). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$

La gráfica muestra la disminución del peso corporal para todos los grupos. No existen diferencias significativas en el cambio de peso corporal entre ninguno de los grupos experimentales ni a lo largo del tiempo. (Figura 27)

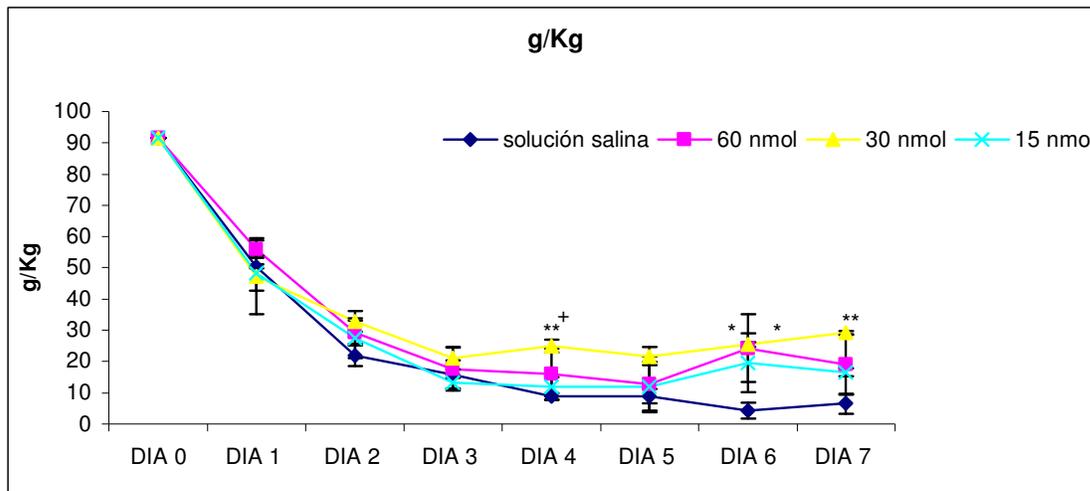
Figura 28. Consumo de alimento



Consumo de alimento con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Se registró diariamente la cantidad de alimento consumido por las ratas del día 0 al día 7. los valores están expresados en promedio del porcentaje de la diferencia con respecto al grupo control(control=100%; promedio de gramos \pm EEM, 7 ± 3.3 g). Análisis ANOVA, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; diferencias con dosis baja: + $p < 0.05$.

El grupo de dosis media mostró una diferencia significativa con respecto al grupo control y a la dosis baja en el día 4 (control = 100 ± 25.8 % ; 2 ± 0.3 g, dosis media= 288 ± 25.4 % dosis baja = 130 ± 35.1 %; $p < 0.01$ M vs. control, $p < 0.05$ M vs. B). En el día 6 la dosis media y la dosis alta mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (control = 100 ± 58 %; 1 ± 0.5 g, dosis media = 597 ± 27.2 %, dosis alta = 558 ± 252.5 %; $p < 0.05$). En el día 7 dosis media mostró diferencias significativas con respecto al control y a la dosis baja (control = 100 ± 49.7 ; 1 ± 0.6 g, dosis media = 458 ± 9.7 %, dosis baja = 247 ± 20.7 %; $p < 0.01$ dosis media vs. control y $p < 0.05$ dosis media vs. dosis baja). (Figura 28)

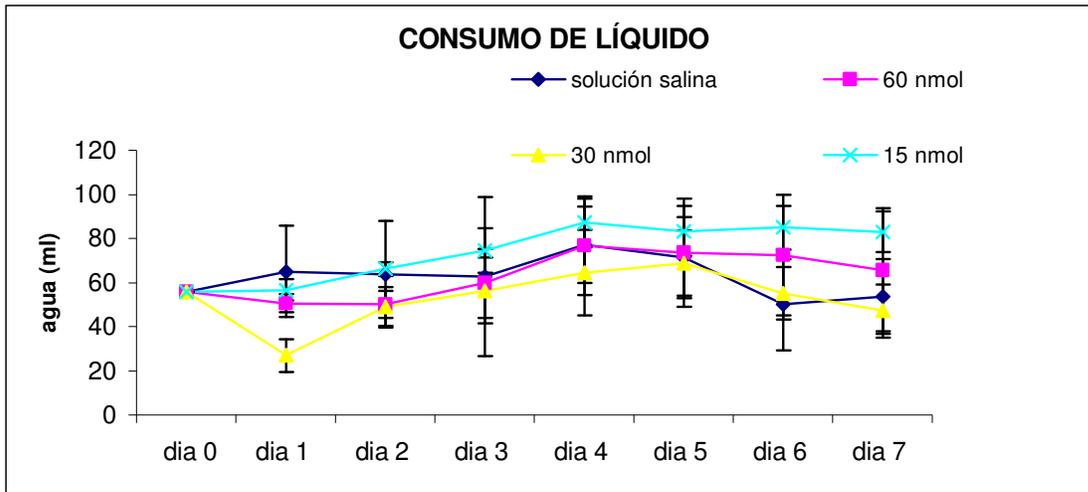
Figura 29. Consumo de alimento con respecto al peso (g/Kg)



Consumo de alimento con respecto al peso en la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Se registró diariamente la cantidad de alimento consumido por las ratas del día 0 al día 7, así como el peso corporal. Los valores están expresados en promedio del porcentaje de la diferencia con respecto al grupo control (c=100%; promedio de gramos/kilogramos \pm EEM, 26 ± 10.7 g/Kg). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; diferencias con dosis baja: + $p < 0.05$.

El grupo dosis media presentó en el día 4 diferencia significativa con respecto a los grupos control y el de dosis baja (control = 100 ± 13.5 %; 9 ± 1.1 g/Kg, dosis media = 282 ± 23 %, dosis baja = 135 ± 34.5 %; $p < 0.01$ dosis media vs. control, $p < 0.05$ media vs. baja). En el día 6 existió diferencia significativa entre los grupos dosis media y dosis alta con respecto al grupo control (control = 100 ± 58.1 %; 4 ± 2.5 g/kg, dosis media = 585 ± 17.3 %, A = 559 ± 250.3 %; $p < 0.05$), así como en el día 7 para el grupo dosis media con respecto al grupo control (control = 100 ± 49.4 %; 6.4 ± 3.2 g/kg, dosis media = 450 ± 9.5 %; $p < 0.01$). (Figura 29)

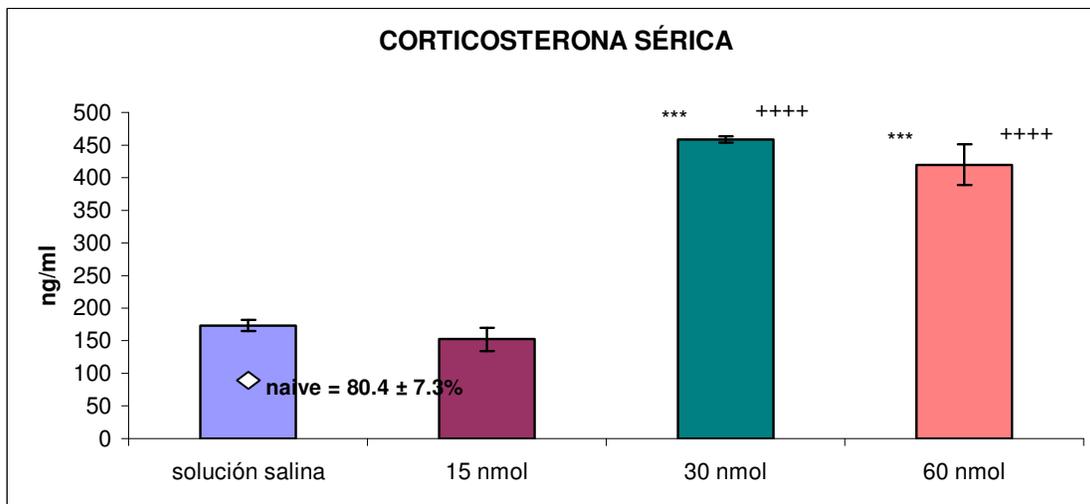
Figura 30. Consumo de líquido



Consumo de alimento con respecto al peso en la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Se registró diariamente la cantidad de alimento consumido por las ratas del día 0 al día 7, así como el peso corporal. Los valores están expresados en promedio del porcentaje de la diferencia con respecto al grupo control (c=100%; promedio de mililitros \pm EEM, 62 ± 3.2 ml). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$.

En el caso del consumo de líquido, se puede observar que no existieron diferencias significativas entre los grupos experimentales. (Figura 30)

Figura 31. Corticosterona sérica

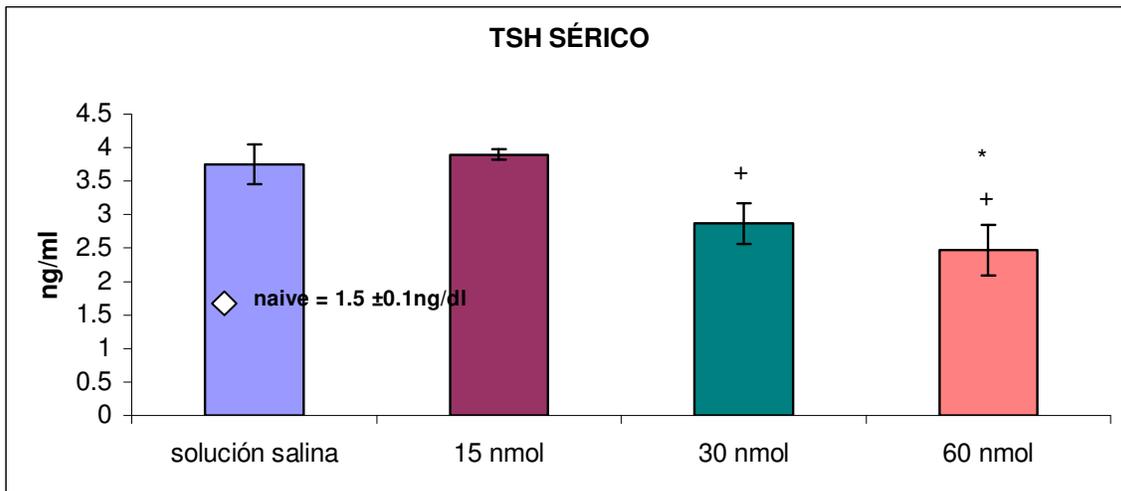


Concentración de corticosterona sérica en la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Corticosterona sérica cuantificada por RIA. Los valores son el promedio de \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/ml. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de

Fisher. El naive es el valor del cual se obtienen los valores en rango normal. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: $***p < 0.001$; diferencias con dosis baja: $++++p < 0.0001$.

La corticosterona presentó un aumento significativo en los grupos de dosis media y dosis alta en comparación tanto con la dosis baja, como con el control para ambos casos (control = $100 \pm 2.7\%$, dosis baja = $77 \pm 13.7\%$, dosis media = $265 \pm 2.9\%$, dosis alta = $228 \pm 21.3\%$; control = 173 ± 8.2 ng/ml, dosis baja = 153 ± 17.9 ng/ml, dosis media = 459 ± 5.1 ng/ml, dosis alta = 420 ± 30.7 ng/ml; $p < 0.001$ dosis media vs control y dosis alta vs control, $p < 0.0001$ media vs baja y baja vs alta). La dosis media no presentó diferencias con la dosis alta, del mismo modo que la dosis baja no presenta diferencias con el control. (Figura 31)

Figura 32. TSH Sérico

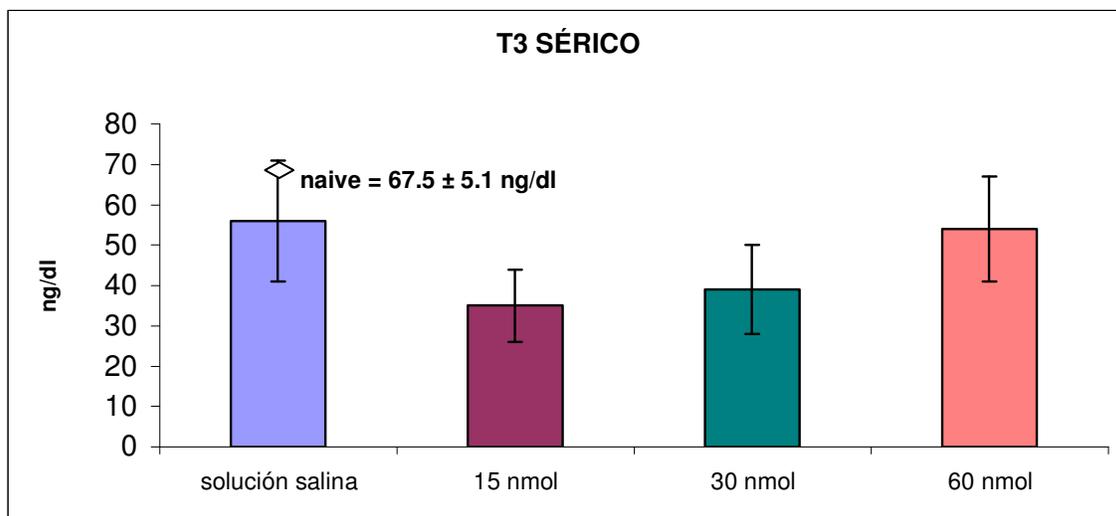


Concentración de TSH sérico en la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo ($n=12$). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. TSH sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/ml. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: $*p < 0.05$; diferencias con dosis baja: $+p < 0.05$.

La dosis alta disminuyó los niveles de TSH sérico con respecto al control y la dosis baja, mientras que la dosis media disminuyó significativamente solamente con respecto a la dosis baja (control = $100 \pm 8.2\%$, dosis baja = $104 \pm 1.5\%$, dosis media = $77 \pm 8.6\%$, dosis alta = $66 \pm 10.1\%$; control = 4 ± 0.3 ng/ml, dosis baja = 4 ± 0.08 ng/ml, dosis media = 3 ± 0.3 ng/ml, dosis alta = 2 ± 0.3 ng/ml; $p < 0.05$ alta vs control, $p < 0.05$ alta vs baja, $p < 0.05$ media vs baja). La dosis baja y el control no presentaron diferencias significativas mutuas, así como sucedió entre la dosis alta y la dosis media. (Figura 32)

Hormonas tiroideas séricas.

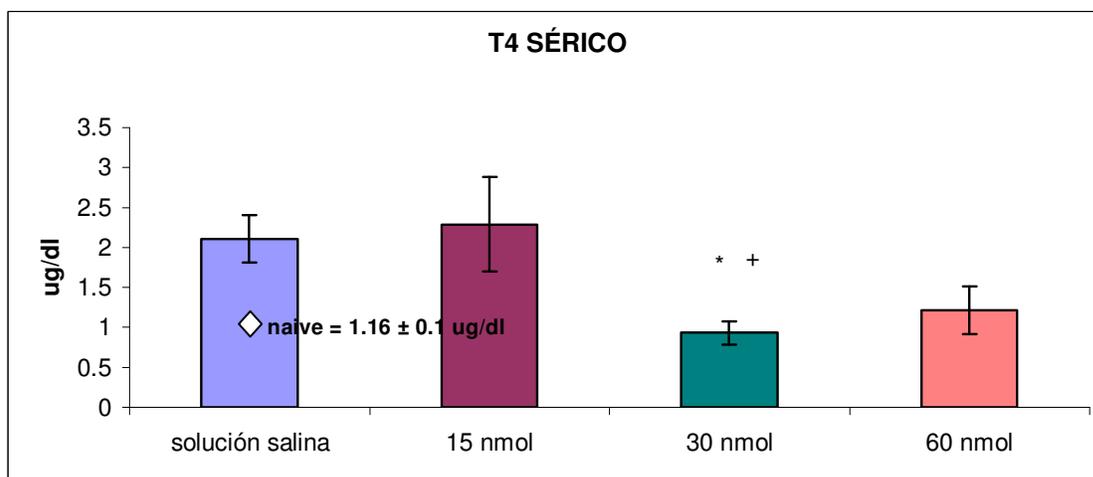
Figura 33. Contenido sérico de T3



Concentración de T3 sérico en la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo ($n=12$). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. T3 sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ng/dl. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$.

No hubo diferencias significativas en los niveles de triiodotironina (T3) entre ningún grupo experimental (dosis baja = $62 \pm 13.7\%$, dosis media = $70 \pm 17.7\%$, dosis alta = $96 \pm 18.5\%$; dosis baja = 35 ± 8.8 ng/dl, dosis media = 39 ± 10.7 ng/dl, dosis alta = 54 ± 12.7 ng/dl) o con respecto al control (control = $100 \pm 18\%$, control = 56 ± 15.8 ng/dl). (**Figura 33**)

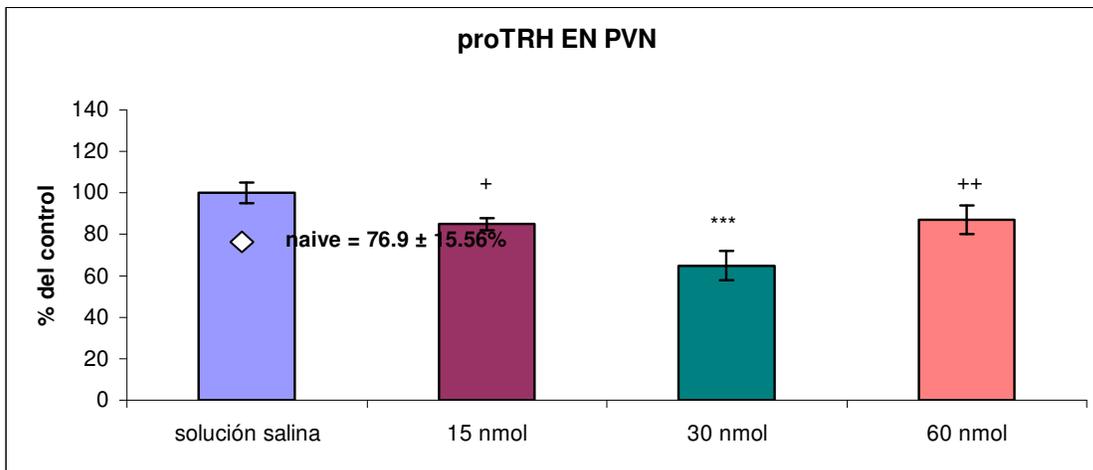
Figura 34. Contenido sérico de T4



Concentración de T4 sérico en la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. T4 sérico cuantificado por RIA. Los valores son el promedio \pm EEM de la concentración de la hormona expresada en ug/dl. Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: * $p < 0.05$; diferencias con dosis baja: + $p < 0.05$.

En el caso de T4, la dosis media presentó una disminución en comparación con los niveles del control y también con respecto a la dosis baja (control = $100 \pm 15.9\%$, dosis baja = $109 \pm 28\%$, dosis media = $44 \pm 7.1\%$; control = 2 ± 0.3 ug/dl, dosis baja = 2 ± 0.5 ug/dl, dosis media = 1 ± 0.1 ug/dl; $p < 0.05$ control vs. media, $p < 0.05$ media vs. baja). Las dosis baja y el control no presentaron diferencias entre ellas y la dosis alta no presentó diferencia significativa con ningún grupo. (Figura 34)

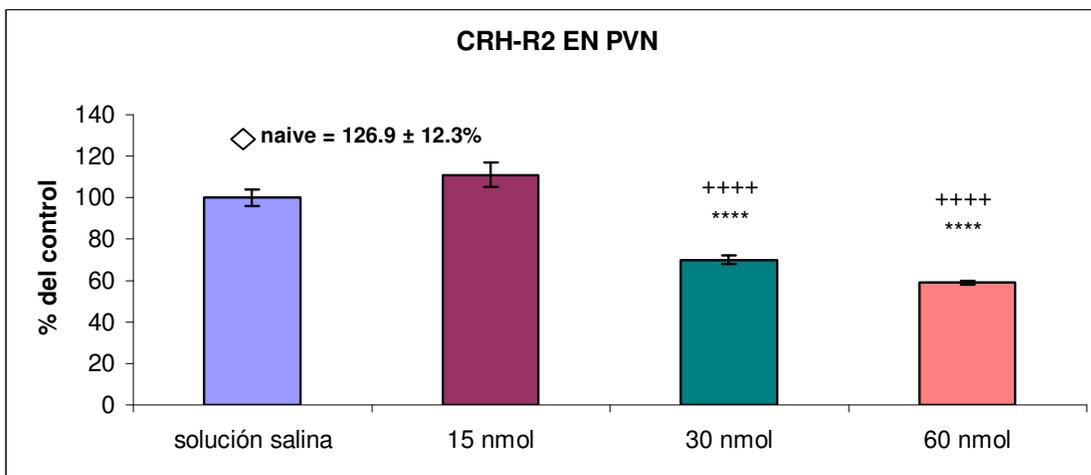
Figura 35. Expresión del gen de proTRH en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo.



Expresión de proTRH en el NPV con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a TRH/ciclofilina \pm EEM y expresados como % del control (control = $100\% \pm$ EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: *** $p < 0.001$; diferencias con dosis media: + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$.

La dosis media causó una disminución del 35 % en los niveles de RNAM de TRH (dosis media = $65 \pm 6.7\%$; $p < 0.001$) con respecto al control ($100 \pm 4.7\%$). Las dosis alta y baja (dosis alta = $87 \pm 6.5\%$, dosis baja = $85 \pm 3.2\%$) no presentaron diferencias con el control, pero sí con la dosis media, que disminuyó un 22 % con respecto a la dosis alta ($p < 0.01$) y un 20 % con respecto a la dosis baja ($p < 0.05$). (Figura 35)

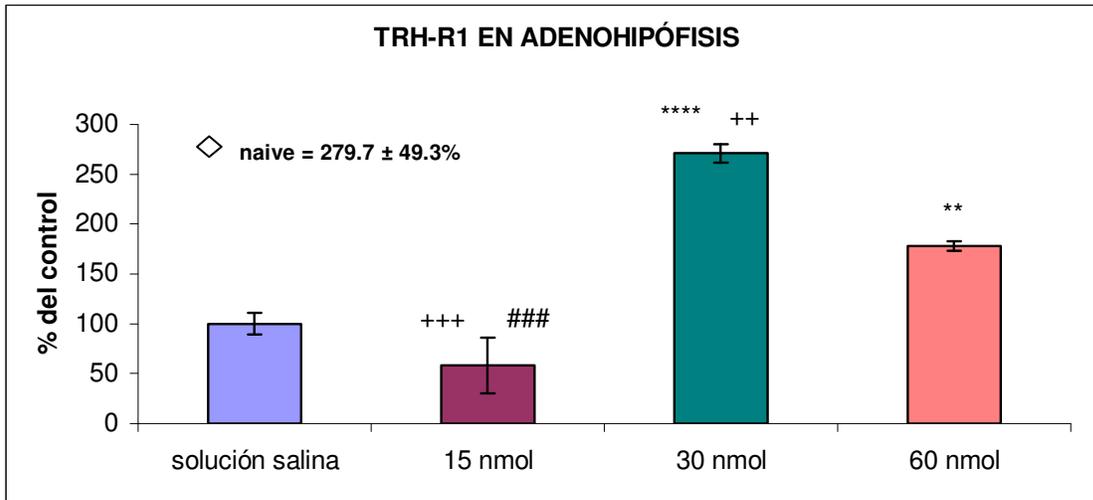
Figura 36. Expresión del gen de CRH-R2 en NPV



*Expresión de CRH-R2 en el NPV con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo (n=12). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina . Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a CRH-R2/ciclofilina \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$; diferencias con dosis baja: ++++ $p < 0.0001$.*

Los niveles de RNAM de CRH-R2 en la dosis media y en la dosis alta disminuyeron significativamente un 30 % y un 41 % respectivamente con respecto al control (dosis media = 70 \pm 2.1 %, dosis alta = 59 \pm 1.1 %, control = 100 \pm 4.1 %; $p < 0.001$ media vs control, $p < 0.0001$ alta vs control). Más aún, la dosis media y la dosis alta presentaron disminuciones significativas de 41 % ($p < 0.0001$) y de 52 % ($p < 0.0001$) con respecto a la dosis baja (111 \pm 5.9 %). **(Figura 36)**

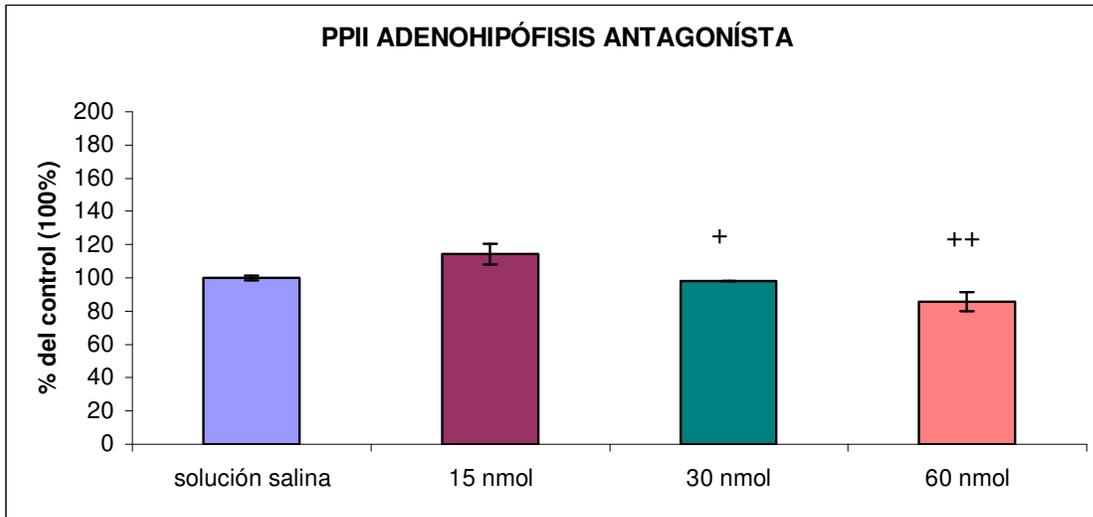
Figura 37. Expresión del gen de TRH-R1 en la adenohipofisis



Expresión de TRH-R1 en la adenohipofisis con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a TRH-R1/ciclofilina \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con el control: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; diferencias con dosis alta: ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$; diferencias con dosis media: #### $p < 0.0001$.

La dosis baja (58 \pm 28.3 %) no mostró diferencia con el control (100 \pm 11.06 %), pero disminuyó con respecto a la dosis alta (178 \pm 5.1 %; $p < 0.001$) y la dosis media (271 \pm 8.8 %; $p < 0.0001$), mostrando diferencias de 120 % y 213 % respectivamente. En cambio, la dosis media mostró un aumento del 171 % con respecto al control ($p < 0.0001$) y un aumento de 93 % con respecto a la dosis alta; ($p < 0.01$). La dosis alta también aumentó con respecto al control en un 78 % ($p < 0.01$). **(Figura 37)**

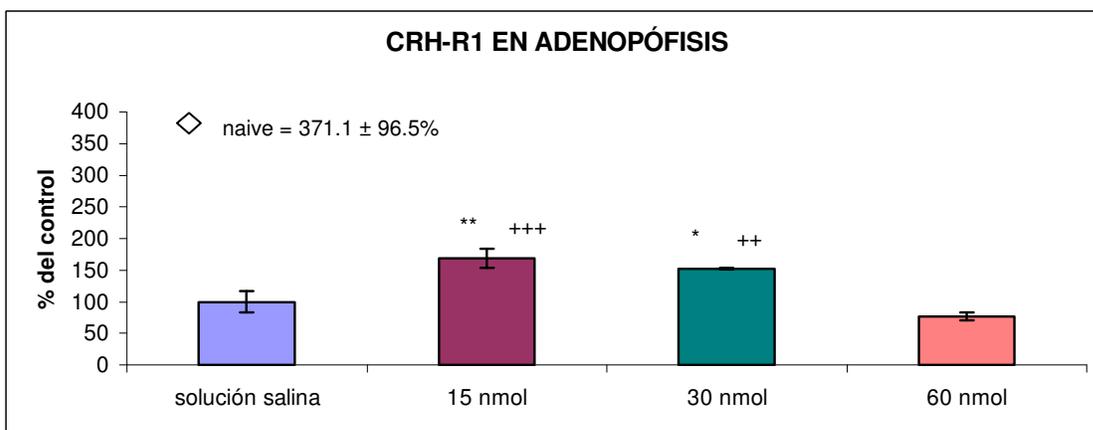
Figura 38. Expresión del gen de PPII en la adenohipofisis



Expresión de PPII en la adenohipofisis con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol; control = solución salina. Naive = $421.07 \pm 87.7\%$ Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a PPII/ciclofilina \pm EEM y expresados en % del control (control = $100\% \pm$ EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con dosis baja: $+p < 0.05$, $++p < 0.01$

La dosis media ($98 \pm 0.03\%$) y la dosis alta ($86 \pm 5.8\%$) mostraron una disminución significativa con respecto a la dosis baja ($114 \pm 6.3\%$) de 16% ($p < 0.05$) y 28.4% ($p < 0.01$) respectivamente. Ninguna dosis presentó diferencia con el control ($100 \pm 1.3\%$). (Figura 38)

Figura 39. Expresión del gen de CRH-R1 en adenohipofisis



Expresión de CRH-R1 en la adenohipofisis con la inyección del antagonista Antisauvagina-30 en el núcleo paraventricular del hipotálamo ($n=12$). Dosis baja = 15nmol; Dosis media = 30 nmol; Dosis alta = 60 nmol;

*control = solución salina. Dicha expresión fue cuantificada a través de la extracción de RNA total por el método de tiocinato de guanidina, seguida de RT-PCR. Los valores son el promedio del cociente de la densidad de la banda correspondiente a CRH-R1/G3PDH \pm EEM y expresados como % del control (control = 100% \pm EEM). Análisis ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Fisher. El naive es el valor observado en condiciones normales. Se consideran diferencias significativas entre grupos cuando $p < 0.05$. Diferencias con control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; diferencias con dosis alta: ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$.*

En la dosis alta (77 ± 6 %) existieron cambios significativos con respecto la dosis baja (170 ± 15.2 %; $p < 0.001$) y la dosis media (152 ± 1.4 %; $p < 0.01$), las cuales aumentaron en un 93 % y 75% respectivamente. Las dosis baja y media presentaron un aumento de 70 % ($p < 0.01$) y de 52 % ($p < 0.05$) con respecto a el control (100 ± 16.7 %). No hubo diferencias significativas entre la dosis baja y el control. **(Figura 39)**

8.0 DISCUSIÓN

Existe evidencia de que la expresión de RNAm de proTRH en la anorexia por deshidratación está mediada por los receptores CRH-R2 del NPV. Los experimentos realizados en este trabajo están destinados a comprobar o refutar esta hipótesis. A continuación, se expone la interpretación de los resultados obtenidos

8.1.1 Cinética de cambios en el peso y el consumo de alimentos en hembras y machos durante 7 días de estrés por deshidratación.

Todas estas mediciones revelaron cambios similares en los grupos AX y RA, tanto en machos como en hembras, tales como pérdida de peso corporal, disminución significativa de la ingesta de alimento (forzada en el caso de RA y voluntaria en el caso de AX) y por lo tanto de g/kg (relación del consumo de alimento con respecto al peso). Estos resultados confirmaron lo observado por Jaimes (2006) en este laboratorio, en donde se observaron las mismas tendencias cuando se sometieron a ratas hembras a estrés por deshidratación durante 7 días. El hecho de que los grupos RA y AX hayan compartido el mismo déficit de pérdida de peso comprueba también que esta es una característica relacionada con la disminución en el consumo de alimento, es decir, independiente de los procesos que marcan diferencias entre RA y AX (como la deshidratación), y que esta afirmación es válida tanto en hembras como en machos, ya que en ambos casos se observa el mismo fenómeno.

8.1.2 Cinética de cambios en el eje HHT en hembras y machos durante 7 días de estrés por deshidratación.

Dado que los cambios más tempranos aparecieron en el día 3, utilizando animales hembra, decidimos empezar la cinética de machos a partir de ese día

proTRH del NPV

Los mamíferos tienen la capacidad de adaptarse a condiciones de ayuno y restricción alimentaria a través de la regulación del eje HHT bajando la tasa metabólica. Esto lo logra a partir de la disminución de los elementos que componen al eje, es decir: se disminuye la expresión de proTRH en el NPV, la concentración de TSH, T4 y T3 séricos (Blake y cols, 1991; van Haasteren 1995 y 1996).

En los animales sometidos a la alimentación pareada con los de deshidratación (RA) se observa una disminución en la expresión de proTRH en el NPV, comparada a los animales control. Esto coincide con los resultados ya reportados para la restricción alimentaria en general (Nillini y cols., 2000; van Haasteren 1995, van Haasteren y cols., 1996; Harris y cols., 2001; Blake y cols., 1991; Zigman y Emquist, 2003; Rondeel y cols., 1992). Los resultados obtenidos en RA pueden estar íntimamente relacionados con el control que la leptina ejerce directamente a través de su acción en las neuronas TRHérgicas del NPV (Nillini y cols., 2000; Harris y cols., 2001), o indirectamente a través de la activación de las neuronas que producen α -MSH y la inhibición de las neuronas que producen NPY, las cuales tienen innervaciones que culminan en las neuronas de TRH en el NPV. En ambos casos, la leptina es capaz de aumentar la síntesis de TRH (Fekete y cols., 2000; Harris y cols., 2001). La reducción en la síntesis de proTRH en RA puede estar ligada a la reducción de leptina que se ha reportado en este caso. (Watts 1999; Jaimes 2006). También, pudo existir una disminución de proTRH en RA a partir del control que un nivel aumentado de corticosterona sérica puede ejercer en la expresión de proTRH (van Haasteren y cols., 1995; Kakucska y cols., 1995).

El efecto es mas acentuado en las hembras al inicio del tratamiento (día 3) si bien al final, ambos géneros alcanzan un 70% de inhibición al 7º día (similar a lo observado por Jaimes, 2006).

La anorexia es un desorden que se caracteriza por niveles normales de TSH y T4, niveles disminuidos de T3 y una respuesta retrasada de TSH a TRH (Muñoz y Argente, 2002).

En ambos sexos, los resultados coincidieron con otros previos, en los que se observó que los niveles de RNAM de proTRH en el NPV de ratas bajo estrés por deshidratación obtuvieron valores parecidos o mayores a los del control en el día 7 (Jaimes, 2003 y 2006). Por otro lado, también se pudo observar que la cinética de expresión de proTRH fue similar en machos y hembras, ya que en ambos casos tendieron a aumentar los niveles de proTRH en AX con respecto al control, para después disminuirlos nuevamente hasta alcanzar valores muy parecidos a los normales, con la diferencia de que en machos estos valores mantuvieron un aumento significativo con respecto al control en el día 7 y en hembras, en este mismo día, los valores no mostraron diferencias con el control. Esto es un indicador de que, a pesar de que la anorexia por deshidratación provocó la activación del eje HHT a nivel de NPV en machos y hembras, los machos obtuvieron una activación mayor de este eje que las hembras. A pesar de que se ha reportado en animales AX una

reducción de leptina y un aumento de corticosterona sérica (Watts y cols., 1999), como en RA, los altos niveles de proTRH indican que existe una dinámica bajo la cual la síntesis de proTRH continua activa, y que no esta relacionada con las disminuciones de leptina o el incremento de corticosterona.

TRH-R1 y PPII de la adenohipófisis.

El TRH, al ser liberado de la eminencia media y ejercer su acción a través de los receptores TRH-R1 que se encuentran en la adenohipófisis, puede ser degradado en el espacio extracelular por la enzima PPII (Heder y cols., 1998), que es una ectoenzima membranal. El TRH tiene la capacidad de disminuir la expresión del RNAM de su receptor tipo 1 de TRH en células de la adenohipófisis (Yang y Tashjian, 1991 y 1993) así como la expresión y actividad de PPII a través de la activación del receptor TRH-R1 en la adenohipófisis (Vargas y cols., 1994 y 2002). En AX, los valores de TRH-R1 se mostraron a lo largo de la cinética, menores o iguales al control, mientras que en RA, los valores tendieron, hasta llegar al día 7, a ser mayores que el control experimental. Estas observaciones coincidieron con el hecho de que TRH-R1 se regula negativamente bajo la presencia de TRH por lo que. niveles bajos de TRH-R1, implican una expresión y secreción elevada de TRH, lo cual apoyaría junto con la activación de las neuronas TRHérgics del NPV de AX, una activación del HHT. Lo opuesto observado en RA (niveles altos de TRH-R1, y expresión disminuida de proTRH) conlleva a la desactivación de este eje, dando lugar a una mayor expresión de TRH-R1. Esto es apoyado por observaciones en animales bajo RA donde existe unión aumentada de TRH-R1 (van Haasteren y cols., 1996).

Los cambios en la expresión de PPII, similares a los de TRH-R1, no alcanzaron significancia estadística si bien se observaron tendencias a la disminución en la expresión de esta metaloenzima en AX, mientras que en RA, la tendencia fue al incremento. Dado que la presencia de TRH puede disminuir la actividad y expresión de PPII, es coherente haber observado estas ligeras disminuciones de la expresión de la enzima tanto en hembras como en machos con AX. El hecho de que estos valores no parezcan diferir del control puede estar indicando un ligero retraso de la secreción del TRH de la eminencia media, fenómeno que se ha observado en la RA prolongada (Van Haasteren, 1996) y que puede que ocurra de forma parcial o disminuida en la AX. Por otro lado, la tendencia al

aumento en la expresión de PPII apoya la disminución de la liberación de TRH en restricción alimentaria.

TSH sérico

TSH es el producto de la acción de TRH sobre sus receptores en la adenohipófisis. Este viaja a través del torrente sanguíneo a la tiroides para dar lugar a la liberación de las hormonas tiroideas. Sus niveles en sangre son pues, un reflejo de la activación del eje tiroideo.

En la AX, el TSH tanto de machos como hembras, mostró un aumento paulatino que se hizo significativo en el día 7 en ambos géneros. La RA, por su parte, mostró en ambos casos niveles significativamente más bajos que AX e iguales o ligeramente más bajos a los del control. Este es un indicador a nivel sérico de la activación del eje HHT en AX y de la ya reportada inhibición del eje en RA, además de una corroboración de las observaciones previas hechas en este laboratorio, en donde se muestran los mismos cambios observados aquí en los niveles de TSH (Blake y cols., 1991; Zigman y Emquist, 2003; Joseph Bravo 2004; Jaimes 2006). Por otro lado, el hecho de que AX presentara niveles de TSH aumentados con respecto al control indica que existe una menor sensibilidad en la adenohipófisis hacia los niveles disminuidos de T3 que existieron también en este grupo.

Hormonas tiroideas (T3 y T4)

Los niveles circulantes de T4 son reflejo de la liberación de TRH hipotalámico y TSH hipofisiario así como de la actividad de las desiodazas que transforman T4 a T3. Si bien los resultados anteriores sugieren un aumento en la liberación de TRH en la anorexia inducida por deshidratación durante 7 días y apoyados por la disminución en la concentración de TRH en la eminencia media (Jaimes 2003), los niveles de T4 se detectaron incrementados sólo en los animales macho durante los días 3 y 5. Al día 7, en ambos géneros, no se presentan diferencias significativas entre AX y el control. Este comportamiento puede estar relacionado con una desensibilización de la glándula tiroides hacia el estímulo provocado por el TSH liberado de la adenohipófisis. Un fenómeno similar ha sido reportado por Laurberg (1989), quien trató tejido tiroideo de perros *in vivo* con TSH durante 28 días, obteniendo en los primeros días niveles elevados de T4 y T3 y en los últimos días niveles subnormales de estas mismas hormonas; los niveles de

tiroglobulina no se alteraron, pero los niveles de T4, T3 y yodo de la tiroglobulina se redujeron para el día 28, en un 50 a 70% en comparación con los controles (Laurberg, 1989). Esta desensibilización no fue debida a la reconocida inhibición de la expresión de sus receptores que causa el mismo TSH (Denereaz y Lemarchand-Beraud, 1995), ya que los efectos de la administración de forskolina y de TSH son similares en cuanto a la cantidad de cAMP producido por lo que el nivel de respuesta del receptor no fue alterada, sino uno o más procesos envueltos en la secreción de la hormona tiroidea después de la generación de cAMP (Laurberg, 1989). Esto sugiere que en este experimento pudo haberse presentado una desensibilización temprana de la glándula tiroidea. Las causas que pudieron dar lugar a este fenómeno son desconocidas y deben ser sujetas a investigación. Por otro lado, el aumento de T4 de los machos en días previos, puede ser el resultado de la inhibición de la desiodasa tipo I reportada para el ayuno durante 48-72 horas en ratas (Aceves y cols., 2003), lo que sugiere que además de la probable desensibilización de la tiroidea, pueden existir otros fenómenos que den lugar a las mediciones observadas.

En contraste con lo observado por Jaimes, no obtuvimos diferencias significativas en los niveles de T4 en los grupos RA de ambos géneros. Este resultado confirma lo observado en la secreción de TSH en estos grupos, con valores normales o subnormales durante la cinética, dando lugar a una secreción equivalente de T4.

Los animales con AX y RA tendieron a presentar valores de T3 séricos menores o iguales al control en machos y en hembras durante toda la cinética tanto en AX como en RA, culminando en el día 7 donde para ambos grupos los valores son más bajos que los valores control. La baja concentración de T3 presente en AX pese a la aparente activación del eje pareciera deberse a una disminución en la actividad de la desyodasa tipo I, que es la responsable de convertir T4 a T3. Este fenómeno ha sido ya observado en el ayuno durante 48-72 horas en ratas (Aceves y cols., 2003). Mientras tanto, los niveles bajos de T3 en RA son un indicador de la ya descrita baja actividad del eje HHT, que además, se ha descrito para otros paradigmas de restricción alimentaria (Blake y cols., 1991; Van Haasteren y cols., 1995 y 1996). El contenido disminuido de T3 parece ser un factor debido al déficit de la ingesta, ya sea forzada o voluntaria.

8.1.3 Cinética de cambios en el eje HHA en hembras y machos durante 7 días de estrés por deshidratación.

CRH-R1 en la adenohipófisis.

El CRH sintetizado en el NPV se transporta a través de axones hasta la eminencia media, en donde pasa al portal sanguíneo para llegar finalmente a la adenohipófisis, donde ejerce sus efectos estimulatorios para la secreción de ACTH a través de los receptores CRH-R1. La expresión de CRH-R1 está controlada, tanto por el CRH y como los glucocorticoides (Aguilera y cols., 2004). El CRH que incide sobre la adenohipófisis reduce la expresión de CRH-R1 (Ochedalski y cols., 1998; Rabadan-Diehl y cols., 1996). Este mismo fenómeno ocurre con los glucocorticoides, donde un aumento de los mismos provoca la inhibición en la expresión del receptor (Ochedalski y cols., 1998). Sin embargo, la aplicación de ambos (CRH y glucocorticoides) contrarresta los efectos inhibitorios que ejercen cada uno por separado (Aguilera y cols., 2004; Ochedalski y cols., 1998; Rabadan-Diehl y cols., 1996; Pozzoli y cols., 1996).

Dadas estas observaciones, podemos pensar que una combinación de niveles bajos de CRH, junto con niveles altos de glucocorticoides provocaría, en un efecto combinado, niveles de CRH-R1 más bien normales. Esta hipótesis se corrobora con nuestros resultados en donde los grupos AX y RA, para los cuales se han reportado en ambos casos una disminución del CRH del NPV acompañada de aumento de corticosterona sérica (Watts y cols., 1999), tendieron en el día 7, a no presentar diferencias con el control.

Corticosterona sérica.

La corticosterona es el producto final de la activación del eje HHA y está relacionada con procesos de estrés cuando se encuentra en niveles altos. Los resultados obtenidos tanto en AX como en RA reflejan un eje HHA activado a través del estrés que la deshidratación y la restricción calórica provocan.

Los niveles de corticosterona elevados confirman que la restricción alimentaria y la deshidratación provocan activación del eje adrenal y que son modelos de estrés, con conductas alimentarias diferenciales. Estos niveles coinciden a su vez con las mediciones previas hechas con este modelo de anorexia (Watts y cols., 1999, Jaimes, 2003 y 2006).

CRH-R2 del NPV

Medimos la expresión de los receptores CRH-R2 en el NPV puesto que se ha observado que en el estrés por deshidratación el único cambio diferencial entre el grupo de AX y RA es el aumento de la expresión de proCRH del hipotálamo lateral en AX, y puesto que las neuronas identificadas como activas tuvieron proyecciones hacia el NPV (Watts, 1999), además de ser el receptor involucrado en los procesos de anorexia producida por CRH (Bale y cols., 2000; Vaughan y cols., 1995; Spina y cols., 1996; Cullen y cols., 2001).

En ambos géneros se detectó una disminución en el contenido de RNAM de CRH-R2 en AX. La disminución en la expresión de CRH-R2 no se observó en cambio, en la RA, donde la tendencia que se desarrolló hasta el día 7 fue, tanto en machos como en hembras, mantener valores similares al control. Lo observado en la RA coincide con lo reportado por Makino y cols. (1998) en donde el ayuno por 4 días no provoca cambios en la expresión del receptor CRH-R2 en el NPV, pero si en el VMH, en donde disminuyeron. Los cambios en CRH-R2 no pueden ser atribuidos al aumento de la corticosterona, ya que ni la adrenalectomía ni la administración de corticosterona modifican la expresión de CRH-R2 del NPV (Makino y cols. 1997). La disminución en la expresión del receptor CRH-R2 provocada por la liberación de CRH es un fenómeno que ya se ha observado en otras áreas que contienen este receptor; por ejemplo, la incubación de tejido adiposo con CRH provoca una disminución en la expresión del receptor CRH-R2. (Cone, 2000; Seres y cols., 2004)

8.2.1 Inyección del antagonista Antisauvagina -30 en el NPV.

Como se mencionó, la corticosterona elevada en el caso de RA es uno de los factores que probablemente activan la disminución en la expresión de proTRH (Van Haasteren y cols, 1995). En el caso de AX, la corticosterona se encuentra elevada y sin embargo proTRH se muestra elevado. Sugerimos que CRH, probablemente activado en el HL (Watts y cols., 1999) y liberado en el NPV (actuando a través de los receptores CRH-R2 que se encuentran en el NPV) puede ser el responsable de activar el eje HHT (Jaimes 2006). Para comprobar esta hipótesis, se midió en el efecto del antagonista específico para el CRH-R2 inyectado directamente en el NPV en la respuesta del HHT de animales

sometidos al estrés por deshidratación. Gracias a los resultados de la cinética de hembras y machos, se pudo determinar, para la inyección del antagonista Antisauvagina -30, la duración del experimento (7 días, ya que es al séptimo día en el que todos los cambios neuroendocrinos y metabólicos se observaron homogéneamente), así como el género de las ratas que serían sometidas al experimento (machos, ya que son estos los que exhibieron cambios neuroendocrinos y metabólicos de forma más uniforme y rápida).

8.2.2 Cambios en el peso y consumo de alimentos después de la Inyección del antagonista Antisauvagina -30 en el NPV.

La inyección de antagonista en el **grupo inyectado con la dosis alta bajo estrés por deshidratación (DA)** (solo en el día 6) y el **grupo inyectado con la dosis media bajo estrés por deshidratación (DM)** (en los días 4, 6 y 7) fue capaz de revertir de forma parcial los efectos del estrés por deshidratación, aumentando la ingesta de alimento y la relación entre la comida consumida y el peso de DA y DM, evidenciando el efecto de la inyección del antagonista en aumentar el consumo de alimento. Estos resultados son similares a lo reportado (Cullen y cols, 2001): la aplicación de urocortina o CRH (1 nmol/día) en conjunto con el antagonista antisauvagina-30 (30 nmol/día) i.v., revierte la inhibición de la ingesta de alimento provocados tanto por CRH como por la urocortina.

Estos autores observaron también, que el antagonista pudo revertir en un 70% el efecto de disminución de peso causado por CRH, sin embargo, esta reversión fue estadísticamente significativa hasta el día 4 del experimento. En nuestro experimento, no se observaron diferencias significativas en el peso entre ninguno de los grupos. Probablemente a tiempos más largos podríamos observar la recuperación de peso, pero ésta sería debida al efecto que como veremos, tiene el bloqueo de los receptores de CRH sobre la expresión de TRH del NPV disminuyendo la concentración de TSH y hormonas tiroideas y el metabolismo basal, evidentes en el día 7.

8.2.3 Efectos específicos de la inyección del antagonista Antisauvagina -30 en el NPV.

La inyección del antagonista a dosis media y alta disminuyó los niveles de RNAM de CRH-R2 en el NPV como ocurre para los antagonistas de receptores opioides:

naltrexona, naloxona y ICI174864 disminuyen transitoriamente la expresión de los receptores opioides deltas en las células NG108-15 antes de inducir un aumento en su expresión (Belcheva y cols., 1992); o, para el antagonista a serotonina, mianserina, en un tratamiento prolongado, disminuye la unión al receptor 5HT-2 y su RNA, efecto que se atribuye a su habilidad de modular la transcripción (Thot y Shenk, 1994).

8.2.4 Cambios en el eje HHA provocados por la inyección de antisauvagina-30 en el NPV.

El antagonista no tuvo efecto en la expresión de CRH-R1; DB y DM presentaron un aumento en comparación con AX y con DA, los cuales no difirieron entre si pero fueron inferiores a los niveles del naive, lo que indica que, a pesar de que existen diferencias entre los niveles de las dosis, no hay una reversión completa de la expresión. Esto es coherente con el hecho de que la antisauvagina- 30 es casi 100 veces mas potente en su unión con el receptor CRH-R2, con un K_i de 153.6 nm para CRH-R1 y un K_i de 1.4 nm para los receptores CRH-R2 β (Rühumann y cols., 1998). En forma similar, no afectó la respuesta de corticosterona causada por AX, como lo observado por Cullen y cols. (2001). DM y DA presentaron una mayor respuesta en comparación con DB y AX. Es posible que el uso del antagonista perturbe las dinámicas del eje de manera semejante a lo descrito en ratones knock-out para CRH-R2 que muestran hipersensibilidad al estrés y comportamientos ligados a la ansiedad (Bale et al., 2000; Coste et al., 2000).

8.2.5 Cambios en el eje HHT provocados por la inyección de antisauvagina- 30 en el NPV

Sólo la dosis media (DM) del antagonista fue capaz de disminuir los niveles de expresión de pro TRH en AX a valores similares a los del control intacto o naive. Los niveles de RNAM de proTRH del grupo de **ingesta de solución salina + inyección de solución salina (CAX)** fueron superiores en comparación con los del control intacto o naive (control no realizado en este experimento, cuyos valores se obtuvieron de experimentos anteriores y que es constituido de animales que consumieron agua sola).

La inyección de antagonista no sólo provocó la disminución de TRH en el NPV estimulada por AX, sino que también parece influir en la liberación del péptido desde la eminencia

media, dado que las dosis media y alta provocaron una disminución de los valores de proTRH, así como de los niveles séricos de TSH, esto último reflejando una inhibición de la liberación. Esto se comprueba también con el aumento en la expresión de TRH-R1.

Los niveles de PPII de ninguno de los grupos inyectados con antagonista difirió de los del control salino o anoréxico, cuyo nivel fue claramente más bajo que el naive a pesar de una aparente normalización de los niveles de TRH. La expresión de PPII no solo se regula por TRH sino también, por hormonas tiroideas ó estrógenos (Shomburg y Bauer, 1995; Uribe y cols., 1991; Ponce y cols., 1988; Bauer 1988., Vargas y cols., 2000) por lo que la diferencia en el contenido hormonal entre los grupos puede explicar los bajos niveles de PPII bajos.

Al igual que para TSH, la secreción de T4 se revirtió con la dosis media demostrando así que el antagonista antisauvagina- 30 evitó la inactivación del eje HHT a diferentes niveles (hipotalámico, adenohipofisiario y sérico) provocado por la deshidratación. Si bien, el incremento no fue obvio en los experimentos de cinética. No obstante, es claro que existe una disminución de T4 en DM contra CAX, por lo que, a pesar de la variabilidad de la medición, la inyección de antagonista si tiene un efecto en la regulación del eje HHT a nivel sérico y que dicho efecto apunta a ser la inhibición de la activación provocada por el estrés por deshidratación. En el caso de T3, se observa una tendencia a la normalización.

Estos resultados indican que la aplicación del antagonista específico de los receptores CRH-R2 es capaz de revertir los efectos de la anorexia por deshidratación restaurando la actividad del eje HHT. Los efectos sobre la síntesis de TRH en el NPV deruvab varias implicaciones:

- 1) Dado que la inyección de antagonista en dosis media es capaz de revertir la expresión de proTRH a valores similares a los del grupo naive (es decir, inhibió la expresión de TRH causada por el estrés por deshidratación)
- 2) podemos inferir que el CRH ejerce control sobre la expresión de TRH en el modelo de estrés por deshidratación. La expresión de CRH incrementada en neuronas del HL que proyectan al NPV (Watts y cols., 1999) podrían ser las responsables de estimular la expresión de TRH en el NPV mediado por los receptores CRH-R2 (Jaimes, 2006). Recientemente se comprobó que, en células hipotalámicas en cultivo, el CRH incrementa los niveles de RNAM de TRH después de una hora de

incubación (A. Cote y P. Joseph-Bravo, no publicado). Estos datos, junto con los aquí presentados apoyan que la expresión de TRH puede estar siendo regulada por CRH, y aunque no se ha definido de donde proviene, es posible que sea del HL.

- 3) El efecto parece ser mediado por los receptores CRH-R2 puesto que su bloqueo a través del antagonista antisauvagina-30 es capaz de mantener los valores de proTRH en DM iguales a los valores naive en contraste con CAX que mantiene el incremento de TRH. Esto mismo ocurre con DB y DA, lo que implica, por un lado, que la dosis baja es insuficiente para bloquear el efecto ejercido por CRH en el NPV y, por otro lado, que la dosis alta, aunque bloquea una cantidad mayor de receptores que la dosis media, puede estar provocando la sensibilización de los pocos receptores que queden libres, inducir una amplificación celular de la respuesta y finalmente activar el control ejercido por el CRH del HL sobre el TRH del NPV, obteniendo niveles muy similares a los de CAX. Este fenómeno se ha observado en receptores acoplados a proteínas G, donde un solo receptor $G\alpha$ puede ser capaz de estimular a la adenil-ciclasa para producir docenas de moléculas de cAMP, amplificando así la respuesta. (Galanter y cols., 2004; Neal 2002; Taylor y Francis, 2000; Langlois y cols., 1996). En estos casos, los antagonistas pueden provocar curvas dosis respuesta con forma de campana.
- 4) El incremento de la ingesta de alimento en DM con respecto a CAX sugiere que el TRH del NPV está implicado en la anorexia ocasionada por el estrés por deshidratación y que esta relación es inversamente proporcional, es decir, entre más expresión de proTRH exista en el NPV, menos ingesta de alimento habrá y viceversa. Esto se corroboró comparando los valores de DM con los valores de CAX y DB, los cuales exhibieron los niveles más altos de RNAM de proTRH y también, el menor consumo de alimento. Estos resultados apoyan la función anoréxica del TRH hipotalámico (Choi y cols., 2002).

9.0 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- A pesar de las diferencias en la cinética de respuesta de los dos géneros al modelo de anorexia por deshidratación, fué el día 7 el que mostró la mayoría de los cambios neuroendocrinos esperados tanto para machos como para hembras.
- El antagonista del receptor CRH-R2 evitó la activación del eje HHT en el estrés por deshidratación, y en particular, de la síntesis de TRH en el NPV.
- La respuesta anoréxica mediada por CRH-R2 parece de carácter conductual y neuroendocrino, ya que el uso de antagonista fue capaz de revertir, no solo los efectos de la deshidratación en la ingesta de alimento, sino parámetros metabólicos como son la expresión de proTRH en el NPV y la concentración sérica tanto de TSH como de T4.

Se propone estudiar más a fondo las diferencias neuroendocrinas entre machos y hembras que pudieran verse afectados en la cinética de cambios en el eje HHT bajo estrés por deshidratación, como por ejemplo, las diferencias funcionales en el eje HHA que puedan ejercer un control en la anorexia por deshidratación dependiendo del género.

Para corroborar la participación del CRH secretado desde el HL, pueden realizarse estudios que impliquen lesiones electrolíticas en este núcleo y estudiar los efectos conductuales y neuroendócrinos que ésto conlleve.

Experimentos donde se realice una inyección de CRH y de antagonistas a CRH-R1 en el NPV pueden ser importantes para fundamentar la especificidad de los resultados obtenidos aquí, además de explorar la posibilidad de una colocalización de la expresión de CRH-R2 con TRH en el NPV.

Sería importante investigar los efectos del antagonista en la liberación de TRH desde la eminencia media, para aclarar los efectos observados tanto en TRH-R1 como en PPII y como esto influye en la liberación de TSH.

Asimismo, es incluir un grupo naive o control intacto propio, parámetro que además de corroborar los resultados aquí obtenidos, les brindaría más validez y fuerza. Del mismo modo, dadas las variaciones obtenidas al medir T4 y T3 totales, se sugiere hacer la

medición del T4 y T3 libres, que es la variedad activa, ya que esto reflejaría de forma más directa los efectos que la inyección de antagonista tiene en la secreción de estas hormonas y en los efectos que estas ejercen en la fisiología

Además, es importante desarrollar estrategias que provean de un modelo animal bajo el cual, el estrés sea reducido al mínimo durante la inyección, para beneficiar las observaciones, como por ejemplo, algún modelo que implique la utilización una minibomba osmótica, con el objetivo de disminuir la manipulación y por ende, el estrés.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	serotonina
α – MSH	hormona α estimulante del melanocito
ACTH	hormona adenocorticotrópica (corticotropina)
AgRP	péptido relacionado al agouti
ARC	núcleo arcuato
ASVG-30	antisauvagina-30
AX	anorexia
BAT	grasa parda
BDNF	factor neurotrópico derivado del cerebro
CART	transcrito regulado por cocaína y anfetamina
CCK	colecistoquinina
CFS	fluido cerebroespinal
CRH	hormona liberadora de la corticotropina
D1	deiodinaza 1
D2	deiodinaza 2
D3	deiodinaza 3
DA	dopamina
DMH	hipotálamo dorsomedial
EAA	aminoácido excitatorio
FFA	ácidos grasos libres
GABA	ácido γ- aminobutírico
Gal	galanina
GLP-1	péptido similar al glucagón 1
GPCR	receptores acoplados a proteínas G
HHA	eje hipotálamo- hipófisis- adrenal
HHT	eje hipotálamo- hipófisis- tiroides
icv	intracerebroventricular
ip	intraperitoneal
HL	hipotálamo lateral
MC4R	receptor de melanocortina
MCH	hormona concentradora de melanina
NE	norepinefrina
NPY	neuropéptido Y
NT	neurotensina
NT/N	neurotensina/neuromedina
OCD	desorden obsesivo compulsivo
POMC	proopiomelanocortina
PTSD	desorden de estrés postraumático
NPV	núcleo paraventricular del hipotálamo
RA	restricción alimentaria
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
SCN	núcleo supraquiasmático
SON	núcleo supraóptico
T3	triiodotironina
T4	tetraiodotironina o tiroxina
TRH	hormona liberadora de la tirotrópica
TSH	tirotrópica
UCN I	urocortina I
UCN II	urocortina II
UCN III	urocortina III
VMH	hipotálamo ventromedial
VP	vasopresina

10.0 BIBLIOGRAFÍA

Aceves C, Escobar C, Rojas- Huidobro R, Vazques- Martinez O, Martinez Merlos T, Aguilar Roblero R, Diaz Muños M, Liver 5'-deiodinasa activity is modified in rats under restricted feedin schedules: evidence for post-translation regulation. *J Endocrinol* 2003; 179(1): 91-96

Aguilera G, Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol*, 1994, 15: 321-350.

Aguilera G, Nikodemova M, Wynn PC, Catt KJ, Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides*, 2004, 25(3): 319-29.

Aguilera G, Rabadan-Diehl C, Vasopressinergic regulation of the hypothalamic – pituitary –adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 2000;96:23–9.

Ahima RS, Prabakaran D, Matanzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos- Flier E, Flier JS, Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 1996, 382- 250-252.

Alkemade A, Unmehopa UA, Wiersinga WM, Swaab DF, Fliers E, Glucocorticoids decrease thyrotropin releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *The Joutnal of clinical endocrinology and metabolism*, 2005, 90(1): 323-27.

Altemus M, Gold PW, Neuroendocrine abnormalities in anorexia nervosa and bulimia nervosa. In *The Biology of feast and famine*, Academic Press, 1992, San Diego, 135-50.

Anand BK, Brobeck JR, Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med*, 1951, 24:123-146.

Antoni FA, Vasopressinergic control adenocorticotropin secretion comes of age. *Front neuroendocrinol*, 1993, 14: 76-122.

Asuka M-O, Tamotsu S, Distribution of Urocortin 2 and Urocortin 3 in Rat Brain". J Nippon Med Sch, 2004, Vol. 71: 358-359.

Aubry JM, Bartanusz V, Jezova D, Belin D, Kiss JZ, Single stress induces long-lasting elevations in vasopressin RNAM levels in CRF hypophysiotrophic neurons, but repeated stress is required to modify VP immunoreactivity. J Neuroendocrinol 1999;11:377–84.

Bale L, Contarino A, Snith GW, Chan R, Gold HL, Swachenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee K-F, Mice deficient corticotropin releasing hormone receptor 2 display anxiety like behavior and are hypersensitive to stress. Nat Genet, 2000, 24: 410-14

Bale L, Picceti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee K-F, Mice deficient of both corticotropin releasing factor receptor 1 and CRFR2 have an impaired stress response and display sexual dichotomus anxiety like behavior. The Journal of Neuroscience, 2002, 22(1):193–199.

Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. Biochimie 1988 70 69–74.

Belcheva MM, Barg J, Gloeckner C, Gao XM, Chuang DM, Cooscia CJ, Antagonist induced transient down regulation of delta opioid receptors in NG-108-15 cells. Mol Pharmacol, 1992, 42(3): 445-52.

Benes FM. Brain development: VII. Human brain growth spans decades. Am J Psychiatry 1998;155:1489.

Bernardis LL, Bleinger LL, The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. Neurosci Behav Rev, 1996, 20:189-287.

Berthoud HR, Multiple neuronal systems controlling food intake and body weight. Neurosci. And Biobehav. Rev., 2002, 26: 393-428.

Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology*. 1991 Nov;129(5):2714-8

Blake, NH, Eckland DJA, Foster, OJF, Lightman SL, Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid durin food deprivation. *Endocrinology* 1991 129:2714-2718

Borrego O. Tratamiento de los transtornos de la conducta alimentaria: anorexia y bulimia. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*,2000, 24(2) : 44-50 .

Bowers CY, Friesen HG, Hwang P, Guyda HJ, Folkers K, Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl- histidyl prolinamide. *Biochem Biophys Res Commun*, 45:1033- 1041.

Brauns O, Liepold T, Raduylovic J, Spiess J, pharmacological and chemical properties of astressin, antisauvagine -30 and alfa-helCRF: significance for behavioral experiments. *Neuropharmacology*, 2002, 41: 507-16.

Britton DR, Koob GF, River J, Vale W, Intraventricular corticotropin releasing factor enhances behavioral effects of novelty. *Life Sci*., 1982, 31: 363-367

Brobeck JR, Mechanism of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions, *Physiol Rev*, 1946, 26: 541-559.

Broberg C, De Lecea L, Sutcliffe JG, Hokfelt , Hypocretin/ orexin and melanin-concentrating- hormone- expressing cells from distinct populations in the rodent lateral hypothalamus : relationship to the neuropeptide Y and agouti gene related protein systems. *Comparative Journal of Neurology*, 1998, 402: 460-474.

Brown MR, Fisher LA, Regulation of autonomic nervous system by corticotropin. Releasing factor. In: De Souza EB, Nemeroff CB, editors. *Corticotropin –releasing factor: basical and clinical studies of a neuropéptido*. Boca Raton FL: CRC Press, 1990, 291-8.

Bruhn TO, Taplin JH, Jackson IMD, Hypothyroidism reduces content and increases *in vitro* release of pro-TRH peptides from the median eminence. *Neuroendocrinology*, 1991, 53: 511-515.

Bulik CM, Sullivan PF, Wade TD, Kendler KS. Twin studies of eating disorders: a review. *Int J Eat Disord* 2000;27:1– 20.

Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Vale W, Guillemin R, Derives polipeptidiques de synthèses doués d'activité hypophysiotrope TRF : nouvelles observations, *CR Acad Sci Hebd Seances Acad Sci*,1969, 269: 226-228.

Campbell RE, Snith MS, Allen SE, Grayson BE, Ffrench – Mullen JM, Grove KL, Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *Journal of Neuroscience*, 2003, 23: 1487- 1497.

Cao J, O'Donnell D, Vu H, Payza K, Pou C, Godbout C, Jakob A, Pelletier M, Lembo P, Ahmad S, Walker P, Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropine releasing hormone receptor. *Journal of biological chemistry*, 1998, 273:32281-32287.

Carey MP, Deterd CH, de Koning J, Helmerhorst F, de Kloet ER. The influence of ovarian steroids on hypothalamic –pituitary –adrenal regulation in the female rat. *J Endocrinol* 1995;144:311 –21.

Coccaro E, Murphy D, editors. Serotonin in major psychiatric disorders. American Psychiatric Press, 1990. p. 153–84.

Cone R, Editorial: the corticotropin releasing hormone system and feeding behavior: a complex web begins to unravel. *Endocrinology*, 2000, 141(8): 2713-15.

Connan F, Campbell IC, Katzman M, Lightman SL, Treasure J, A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol and Behav*, 2003, 79: 13-24.

Connan F, Campbell IC, Lightman SL, Landau S, Wheeler M, Treasure J. Investigation of the hypothalamic pituitary adrenal axis in anorexia nervosa using a combined DXM/CRH neuroendocrine challenge test. *Am J Psychiatry* 2003 [submitted for publication].

Connan F, Campbell IC, Lightman SL, Landau S, Wheeler M, Treasure J. The hypothalamic pituitary adrenal axis in anorexia nervosa: effects of an arginine vasopressin neuroendocrine challenge test. *Am J Psychiatry* 2003 (submitted).

Couturier J, Psychiatric comorbidity in eating disorders. *The Canadian Journal of OME*, 2004, February, 81-85

Cowen PJ, Anderson IM, Fairbum CG, Neurochemical effects of dieting: relevance to changes in eating and affective disorders. In *The biology of feast and famine*, Academic Press, 1992, San Diego CA, 264-84.

Cruz C, Charli JL, Vargas MA, Joseph-Bravo P, Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem*, 1991, 56: 1594-1601.

Cullen MJ, Ling N, Foster AC, Pelleymounter MA, Urocortin, corticotropin releasing factor-2 receptors and energy balance. *Endocrinology*, 2001, 142(3): 992-9.

Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y (NPY) and agouti-related protein (AgRP). *Endocrinology*, 2004, 145: 2607-2612.

Charli JL, Méndez M, Vargas MA, Cisneros M, Assai M, Joseph-Bravo P, Wilk S, Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides*, 1989, 14: 191-6.

Charli JL, Vargas MA, Cisneros M, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P et al, TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*, 1998, 6: 45–57.

Choi Y-H, Hartzell D, Azain MJ, Baile CA, TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav*, 2002, 77:1-4.

Chronwall BM, Anatomy and Physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. *Peptides*, 1985, 6 [Suppl 2]:- 11.

De Gortari P, Fernández- Guardiola A, Martínez A, Cisneros M, Joseph Bravo P, Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res*, 1995, 679: 144-50.

De Gortari P, Joseph Bravo P, Neuroendocrine regulation of energy homeostasis, *Mol Endocri*, 2006, 65-85

De Gortari P, Romero F, Cisneros M, Joseph Bravo P, Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and RNAM levels in rat limbic regions. *Neurochem Int*. 2005,46(4):347-56.

De Groef B, Goris N, Arckens L, Kühn ER, Darras VM, Corticotropin releasing hormone (CRH) -induced thyrotropin release is mediated through CRH receptor type 2 on thyrotropes. *Endocrinol*, 2003, 144(12): 5537-44.

De la Pena P, Delgado LM, Del Camino D, Barros F, Two isoforms of the thyrotropin releasing hormone receptors generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *Journal of biological chemistry*, 1992, 267: 25703-8.

Denereaz N, Lemarchand- Beraud T, Severe but not mild alterations of thyroid function modulate the density of thyroid stimulating hormone receptors in thyroid gland. *Endocrinol.*, 1995, 136(4): 1694-1700.

Denver RJ, Several hypothalamic peptides stimulate *in vitro* thyrotropin secretion by pituitaries of anuran amphibians. *Gen Comp Endocrinol* , 1988,72:383–393

Denver RJ, Licht P , Neuropeptides influencing pituitary hormone secretion in hatching turtles. *J Exp Zool*, 1989, 251:306–315

De Souza EB, Corticotropin- releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 1995, 20: 789-819

De Souza E, Nemeroff C, Corticotropin releasing factor: basic and clinical studies of a neuropeptide, CRC Press, 1990, Boca Raton, FL.

Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, Vaughan JM, Vale WW, Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology*, 1996, 137: 2167-2170.

Dunn AJ, Berridge CW, Physiological and Behavioral responses to corticotropin-releasing- factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?. *Brain Res Rev*, 1990, 15: 71-100.

Duthie SM, Taylor PL, Anderson L, Cook J, Edine KA, Cloning and functional characterization of human TRH receptor. *Molecular cell endocrinology*, 1993, 95: R11-R15.

Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paul WI, Kaplan MM, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM, Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of the thyrotropin releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci*, 1987, 84: 7329-7333

Eckert E, Pomeroy C., Raymond N., Kokeler P., Thuras P., Bowers C., Leptin in Anorexia Nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998, 83 (3): 791- 795.

Elias CF, Saper CB, Maratos –Filier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GB, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK, Chemical defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area, *Comparative Journal of Neurology*, 1998, 402: 442-459.

Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB, Distributions of leptin receptor RNAM isoforms in the rat brain. *J Cimp Neurol*, 1998, 395: 535-47.

Everitt BJ, Hökfelt T, The coexistence of neuropeptide Y with other peptides and amines in the central nervous system. In: Mutt V, Fuxe K, Hökfelt T, Lunberg J (eds). *Neuropeptide Y*. Raven Press, 1989, New York, pp. 61-72.

Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GZ, Zhao C, Darnell R, Friedman JM, Anatomic localization of alternative spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 70001-70005.

Fekete C, Légradi G, Mihály E, Huang Q, Tatro J, Rand W, Emerson C, Lechan R, alfa melanocyte stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotroping releasing hormone- synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting induced suppression of prothyrotroping releasing hormone gene expression. *Journal of Neuroscience*, 2000, 20(4): 1550-1558.

Fekete C, Singru PS, Sanchez E, Sarkar S, Christoffele MA, Riberio RS, Rand WM, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM, Differential effects of central leptin, insulin or glucose administration during fasting in the hypothalamic- pituitary- thyroid (HPT) axis and feeding related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology*, 2005, 147(1): 520-9.

Finely JC, Maderdrut JL, Petrusz P, Immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, 1981, 198: 541-565.

Finely JC, Lindstrom P, Petrusz P, Immunocytochemical localization of beta-endorphin- containing neurons in the fat brain. *Neuroendocrinology*, 1981, 33:28-42.

Flier JS, Clinical review 94: what's in a name. In research of leptin's physiologic role. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 1407-1413.

Foppiani L, Sessarego P, Valenti S, Falivene MR, Cuttica CM, Giusti DM. Lack of effect of desmopressin on ACTH and cortisol responses to ovine corticotropin-releasing hormone in anorexia nervosa. *Eur J Clin Invest* 1996;26:879–83.

Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:128– 34.

Frank GK, Kaye WH, Meltzer CC, Price JC, Greer P, McConaha C, Skovira K. Reduced 5-HT_{2A} receptor binding after recovery from anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 2002;52:896–906.

Friedman JM, Halaas JL, Leptin and the regulation of body wight in mammals. *Nature (Lond)*, 1998, 395: 763-770.

Gahan LG, Sevarino KA, Preprothyrotropin releasing hormone RNAM in the rat central gray is strongly and persistently induced during morphine withdrawal. *Neuropeptides*, 1996, 30:207-212.

Galanter JM, Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW, Arnaout RA, Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Lippincot Williams & Wilkins, 2004, pags. 24-25.

Gale SM, Castracane VD, Mantzoros CS, Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. American Society of Nutritional Sciences, 2004, 134: 295-298.

Garat G, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P, Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in the rat brain. *Neuropeptide*, 1985, 6: 27-40.

Geris KL, Kotanen SP, Berghman LR, Kuhn ER, Darras VM, Evidence of a thyrotropin-releasing activity of ovine corticotropin-releasing factor in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Gen Comp Endocrinol* , 1996,104:139–146

Gilles G, Linton EA, Lowry PF, Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*, 1982, 299:355- 357.

Grandison L, Guidotti A, Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin. *Neuropharmacology*, 1977, 16:533-536.

Griffiths EC, Thyrotrophin releasing hormone: endocrine and central effects. *Psychoneuroendocrinology*, 1985, 10:225- 235.

Grinsponn S. Gulick T, Askari H, Landt M, Lee K, Anderson E, Ma Z, Vignati L, Bowsher R., Herzog D., Klibanski A., Serum Leptin Levels in women with anorexia nervosa. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996, 81 (11): 3961-3863.

Gold PW, Kaye W, Robertson GL, Ebert M. Abnormalities in plasma and cerebrospinal-fluid arginine vasopressin in patients with anorexia nervosa. *N Engl J Med* 1983;308:1117– 23.

Goldman CK, Marino L, Leibowitz SF, Postsynaptic α_2 - noradrenergic receptors mediate feeding induced by paraventricular nucleus injection of norepinephrine and clonidine. *European Journal of Pharmacology*, 1985, 115:11-19.

Gómez G, Detección de anomalías de la conducta alimentaria en estudiantes universitarios: obesidad, bulimia y anorexia nerviosa. *Revista Mexicana de Psicología*, 1993, Vol. 10: 17-26.

González L, Unikel C, Cruz C, Caballero A, Personalidad y trastornos de la conducta alimentaria. *Salud mental*, 2003, 26(3):18.

Guan XM, Yu H, Van der Ploeg HL, Evidence of altered hypothalamic pro-opiomelanocortin/ neuropeptide Y RNAM expression in tubby mice. *Brain Research Molecular Brain Research*, 1998, 59: 273- 279.

Guo PW, Gwirtsman H, Avgerinos PC, et al., Abnormal hypothalamic –pituitary– adrenal function in anorexia nervosa: pathophysiological mechanisms in underweight and weight- corrected patients. *N Engl J Med*, 1983, 314.1335.

Harris M, Aschkenasi C, Elias C, Chandrankunnel A, Nillini E, Bjorbaek C, Elmquist J, Flier J, Hollenberg A, transcriptional regulation of the thyrotropin releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *Journal of clinical investigation*, 2001, 107(1):111-120.

Hashimoto K, Suemaru S, Takao T, Sugawara M, Makino S, Ota Z. Corticotrophin-releasing hormone and pituitary adrenocortical response in chronically stressed rat. *Regul Pept* 1988;23:117– 26.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Baldwin HA, Rassnick S, Button KT, Koob GF, Anti- stress action of corticotropin releasing factor antagonist on behavioral reactivity to stressors of varying type and intensity. *Neuropharmacology*, 1994, 77: 179-86.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GB, Corticotropin- releasing-factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res*, 1993, 611: 18-24.

Heuer H, Schäfer MK-H, Bauer K, The thyrotropin- releasing hormone degrading ectoenzyme: the third element of the thyrotropin releasing hormone signaling system. *Thyroid*, 1998, 8(10): 915-920.

Horvarth TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M, Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance, a hypothalamic perspective. *Endocrinology*, 2001, 142: 4163-69.

Horvarth TL, Diano S, Van de Pol AN, Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *Journal of Neuroscience*, 1999, 19: 1072- 1087.

Hsieh YS, Yang SF, Kuo DY, Amphetamine, an appetite suppressant, decreases neuropeptide Y immunoreactivity in rat hypothalamic paraventriculum. *Regul Pept.* 2005 Apr 15; 127(1-3):169-76.

Hudson J, Laffer P, Pope H, Bulimia related to affective disorders by family history and responses to dexamethasone suppression test. *Am J Psychiatry*, 1982, 139(5): 685-7.

Hunag XF, Han M, South T, Storlien L, Altered levels of POMC, AgRP y MC4- R RNAM expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high- energy diet- induced obesity. *Brian Research*, 2003, 992: 9-19.

Huo L, Munzberg H, Nillini EA, Bjorbaek C, Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic TRH gene expression by leptin. *Endocrinology*, 2004, 145(5): 2516-2523.

Imaki T, Xiao Quan W, Shibaski T, Yamada K, Harada S, Chikada N, Naruse N, Dermura H, Stress induced activation of neuronal activity and corticotropin releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *Journal of clinical investigation*, 1995, 96: 231-8.

Itadani H, Nakamura T, Itoh J, Iwassa H, Kanatani A, Borkowski J, Ihara M, Ohta M, Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin releasing hormone receptors. *Biochemical and biophysical research communications*, 1998, 250:68-71.

Jackson IM, The thyroid axis and depression. *Thyroid*. 1998 Oct;8(10):951-6.

Jacobson L, Hypothalamic- pituitary- adrenocortical axis regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2005, 34(2): 271-292.

Jezova D, Jurankova E, Mosnarova A, Kriska M, Skultetyova I, Neuroendocrine response during stress with relation to gender differences. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1996, 56 (3): 779-85.

Kachaturian H, Lewis ME, Shafer MKH, Watson SJ, Anatomy of CNS opioid system. *Trends Neurosci*, 1985, 8: 111-119.

Kakucska I, Qi Y, Lechan RM, Changes in adrenal status affects hypothalamic thyrotropin releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin releasing hormone. Endocrinology, 1995, 136:2795-2802.

Kakucska I, Rand W, Lechan RM, Thyrotropin releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by triiodothyronine and thyroxine. Endocrinology, 1992, 130: 2845-2850.

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS, Interacting appetite- regulating pathways in the hypothalamic regulation of the body weight. Endocrine Reviews, 1999, 20(1): 68- 100.

Kalra SP, Sahu A, Dube MG, Bonavera JJ, Kalra PS, Neuropeptide Y and its neural connections in the etiology of obesity and associated neuroendocrine and behavioral disorders. In: Bray GA, Ryan DH (eds) Molecular and genetic aspects of obesity. LSU Press, 1996, Baton Rouge, LA, Vol. 5: 219-232.

Kaye WH, Berretini W, Gwirtsman HE y cols. Altered cerebrospinal fluid neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa. Arch Gen Psychiatry, 1990, 147:548-556

Kaye WH, Ebert MH, Raleigh M, Lake R, Abnormalities in CNS monoamine metabolism in anorexia nervosa. Archives of General Psychiatry, 1984, 41:350-5.

Kaye WH, Gwirtsman HE, George DT, Ebert MH. Altered serotonin activity in anorexia nervosa after long-term weight restoration. Does elevated cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid level correlate with rigid and obsessive behavior? Arch Gen Psychiatry 1991;48: 556– 62.

Kaye WH, Ma XM, Lightman SL, Anorexia nervosa, obsessional behavior, and serotonin. The arginine vasopressin and corticotrophinreleasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. J Physiol 1998;510(Pt 2):605– 14

Kelly AB, Watts AG, The mediation of dehydration- induced peptidergic gene expression in the rat lateral hypothalamic area by forebrain afferent projections, *J, Comp. Neurol*, 1996, 370: 231-246.

Kelly AB, Watts AG, The region of the pontine parabrachial nucleus is a major target of dehydration- sensitive CRH neurons in the rat lateral hypothalamic area, *The journal of comparative neurology*, 1998, 394: 48-63.

Kelly J, Ahleid GF, Newberg A, Grossman SP, GABA stimulation and blockade in the hypothalamus and midbrain: effects on feeding and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav*, 1977, 7:537-541.

Kelly J, Grossman SP, GABA and hypothalamic feeding systems. *Brain Res Bull*, 1980, 5: 237-244.

Kelly J, Rothstein J, Grossman SP, GABA and hypothalamic feeding systems. I. Topographic analysis of the effects of microinjections of mucusimol. *Physiol Behav*, 1979, 23: 1123-1134.

Kim MS, Small C, Stanley S, Morgan D, Seal L, Kong W, Edwards C, Abusnana S, Sunter D, Ghatei M Bloom S, The central melanocortin system affects hypothalamic pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *Journal of clinical investigation*, 2000, 105(7): 1005-11.

Kiriike N, Nishiwaki S, Izumiya Y, Maeda Y, Kawakita Y, Thyrotropin, prolactin, and growth hormone responses to thyrotropin releasing hormone in anorexia nervosa and bulimia. *Biological Psychiatry*, 1987, 22:167-76.

Kojima M, Hosada H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K, Ghrelin is a growth- hormona releasing acylated peptide from stomach. *Nature (Lond)*, 1999, 402: 656-660.

Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT, Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin releasing hormone RNAM in the paraventricular nucleus. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 7329-7333.

Koob GF, Heinrichs SC, Pich EM, Menzaghi F, Baldwin H, Miczek K, et al., The role of corticotropin releasing factor in behavioral responses to stress. Ciba Found Symp, 1993, 172: 277-89.

Krahan DD, Gosnell BA, Grace M, Levine AS, CRF antagonist partially reverses CRF and stress induced effects on feeding. Brain Research Bulletin, 1986, 17:285-9.

Krahan DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE, Behavioral effects of corticotropin releasing factor: localization and characterization of central effects. Brain Res, 1988, 443: 63-69.

Krahan DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE, Localization of the effects of corticotropin releasing factor on feeding. Program of the 14th annual meeting of the society for neuroscience, 1984, vol 10:302 (abstract)

Kubek MJ, Lpw WC, Sattin A, Morzorati SL, Meyerhoff JL, Larsen SH, Role of TRH in seizure modulation. Ann NY Acad Sci, 1989, 553: 286- 303.

Kyrkouli SE, Stanley BG, Leibowitz SF, Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. Eur J Pharmacol, 1986, 122:159-160.

Kyrkouli SE, Stanley BG, Seirafí RD, Leibowitz SF, Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide`s effects in the brain. Peptides, 1990, 11:995-1001.

Larsen DA, Swanson P, Dickey JT, Rivier J, Dickhoff WW, In vitro thyrotropin releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Gen Comp Endocrinol, 1998, 109:276–285

Laurberg P, Paradoxically subnormal serum T4 and T3 in dogs after prolonged excessive TSH stimulation of the thyroid caused by post-cAMP refractoriness of thyroid hormone secretion. *Metabol*, 1989, 38(3): 265-70.

Lechan RM, Update on thyrotropin- releasing- hormone. *Thyroid Today*, 1993, 16:1-11.

Lechan RM, Fekete C, The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res*. 2006;153:209-35.

Lechan RM, Kakucska I, Feedback regulation of thyrotropin releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. In. *Functional anatomy of the neuroendocrine hypothalamus*. Wilwy, 1992, Chichester UK, 144-164.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM, Leptin prevents fasting induced suppression of prothyrotropin releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 1997, 139(6): 2569-76.

Legradi L, Lechan RM, The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y innervation of thyrotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 1998, 139(7): 3262-70.

Legradi G, Rand WM, Hitz, S, Nillni EA, Jackson IMD, Lechan RM, Opiate withdrawal increases proTRH gene expression in the ventrolateral column of the midbrain periaqueductal gray. *Brain Res*, 1996, 729: 10-19.

Leibowitz SF, Brown O, Tretter JR, Kirshgessner A, Norepinephrine, clonidine, and tricyclic antidepressant selectively stimulate carbohydrate ingestion through noradrenergic system of the paraventricular nucleus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1985, 23:541-50.

Leibowitz S, Wortley K, Hypothalamic Control of energy balance: different peptides, different functions, *Peptides* 2004; 25:473-504

Levine AS, Kneip J, Grace M, Morley JE, Effect of central administered neurotensin on multiple feeding paradigms. *Pharmacol Biochem Behav*, 18: 19-23.

Lewis KE, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, Vaughan J, Reyes TM, Gulyas J, Fischer W, et. al., identification of urocortin III and additional member of the corticotropin releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 7570-75.

Lin MT, Chu PC, Leu SY, Effects of TSH, TRH, HL and HLRH on thermoregulation and food and water intake in the ray. *Neuroendocrinology*, 1983, 37:206-11.

Lin J, Wilk S, Quantization and regulation of pyroglutamyl prptidase II messenger RNA levels in rat tissues and GH3 cells. *Neuroendocrinology*, 1998, 67:197-208.

Loosen PT, The TRH- induced TSH response in psychiatric patients: a possible neuroendocrine marker. *Psychoneuroendocrinology*, 1985, 10:237-60.

Lund TD, Munson DJ, Haldy ME, Handa RJ Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol*, 2004, 16:272-278

Ma X-M, Aguilera G, Differential regulation of corticotropin releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology*, 1999, 140 (12): 5642-5650.

Makino S, Nishiyama M, Asaba K, Gold PW, Hashimoto K, Altered expressions of type 2 CRH receptor RNAM in the VMH by glucocorticoids and starvation. *Am J Physiol*, 1998, 275 (4 Pt 2): R1138-1145.

Makino S, Takemura T, Asaba K, Nishiyama M, Takao T, Hashimoto K, Differential regulation of type-1 and type-2 alpha corticotropin releasing hormone receptor RNAM in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res mol Brain Res*, 1997, 47(1-2):170- 176.

Martínez V, Wang L, Rivier JE, Vale W, Taché Y, Differential actions of peripheral corticotropin releasing factor CRF, urocortin II and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. JPET, 2002, 301: 611-17.

Matre V, Karlsen HE, Wright MS, Lundell I, Fjeldheim AK, Gabrielsen OS, Larhammar D, Gautvik KM, Molecular cloning of a functional human thyrotropin releasing hormone receptor. Biochemical and biophysical research communications, 1993, 195: 179-185.

Matsubayashi S, Tamai H, Uehata S, Kobayashi N, Mori, K, Nakagawa T, Kumagai LF, Anorexia nervosa with elevated serum TSH, Psychosomatic Medicine, 1988, 50:600-6

McGivern RF, Rittenhouse P, Aird F, Van de Kar LFD, Redei E, Inhibition of stress-induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat preprothyrotroping releasing hormone (178-199). J Neurosci, 1997, 17: 4886- 4894.

McIntosh J, Anisman H, Merali ZS. Brain Res Dev Brain Res 1999;113:97– 106.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P, Localizaton of leptin receptor RNAM and the long form splice variant (Ob-Rb) in maose hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. FEBS Lett, 1996, 387: 113-116.

Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Aggarwal A, Herzog DB, Neubauer G, Breu J, Klibanski A, hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin and free leptin index in adolescents girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89: 4972-4980.

Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A, Secretory dynamics of leptin in adolescents girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289: E373- E381.

Moga MM, Saper CB, Gray TS, Neuropeptide organization of the hypothalamic projections to the parabrachial nucleus in the rat, *J Comp Neurol*, 1990, 295: 662-682.

Monnikes H, Heymann- Monnikes I, Tache Y, CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus induces dose- related behavioral profiles in rats. *Brain Res*, 1992, 574: 70-76.

Moral de la rubia J, Los trastornos de la conducta alimentaria, un complejo fenómeno biopsicosocial., *Revista Salud Publica y Nutrición*, 2002, Vol. 3 No.3 Julio-Septiembre.

Morley JE, Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr Rev*, 1981, 2: 396-436.

Morley JE, Neuropeptide regulation of appetite and weight, *Endocr Rev*, 1987, 8: 256-287.

Morley JE, Levine AS, Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci*, 1982, 31: 1459- 1464.

Morle JE, Levine AS, Kneip J, Grace M, The effect of vagotomy on the satiety effects of neuropeptides and nalaxone. *Life Sci*, 1982, 30: 1943-7.

Moschos S, Chan JL, Matanzoros CS, Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril*, 2002, 77: 433-444.

Motta M, *Brian Endocrinology*. Raven Press, 1991, New York, 1-483.

Muñoz M, Argente J, Anorexia nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *European journal of endocrinology*, 2002, 147:257-86.

Müller MB, Preil J, Renner U, Zimmermann S, Kresse AE, Stalla GK, Keck ME, Holsboer F, Wurst W, Expression of CRH-R1 and CRH-R2 in mouse pituitary and adrenal gland: implications on HPA system regulation. *Endo*, 2001, 142(9): 4150-53.

Nagai K, Nishio T, Nakagawa H, Nakamura S, Fukuda Y, Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei in the circadian rhythm of food- intake. *Brain Res*, 1978, 142: 384-389

Neal MJ, Medical pharmacology at a glance. Blackwell Publishing, 2005, pag 11.

Nilini EA, Sevarino KA, The biology of pro- thyrotropin.- releasing hormone -derived peptides. Endocrine Reviews, 1999, 20(5): 599

Nilini EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbaek C, Filier J, Leptin regulates prothyrotropin releasing hormone biosynthesis. Journal of biological synthesis, 2000, 275(46): 36124-33.

Ochedalski T, Rabadan- Diehl C, Aguilera G, Interaction between glucocorticoids and corticotropin releasing hormone (CRH) in the regulation of the pituitary CRH receptor in vivo in the rat. J Neuroendocrinol, 1999, 11:419-18.

O'Connor B, O'Cuinn G, Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes og guinea- pig brain. Eur J Biochem, 1984, 271-78.

O'Dowd BF, Lee DK, Huang W, Nguyen T, Cheng R, Liu Y, Wang B, Gershengorn MC, George SR, TRH-R2exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. Molecular endocrinology, 14:183-93.

Ostlund R, Yang J, Klerin S, Gingerich R, Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age and metabolic covariates. Jornual of clinical endocrinology and metabolism, 1996, 81(11): 3909-3913.

Pelleymounter MA, Joppa M, Ling N, Foster AC, Pharmacological evidence supporting a role for central corticotropin releasing factor₂ receptors in behavioral, but not endocrine, response to environmental stress, The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2002, 302: 154-152.

Pelleymounter MA, Joppa M, Carmouche M, Cullen MJ, Brown B, Murphy B, Grigoriadis DE, Ling N, Foster AC, Role of corticotropin releasing factor (CRF) receptors in the anorexic syndrome induced by CRF¹. JPET, 293(3): 799-806.

Pepin M-C, Pothier F, Baedin N, impaired type II glucocorticoid receptor function in mice bearing antisense RNA transgene. *Nature*, 1992, 23:99-103.

Perrin MH, Vale WW, Corticotropin releasing factor and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 885: 312-28.

Plotsky PM, Bruhn TO, Vale W, Central modulation of immunoreactive corticotrophin-releasing factor secretion by arginine vasopressin. *Endocrinology* 1984;115:1639–41.

Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin releasing factor (CRF) RNAM, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1993;18:195– 200.

Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P, Tissue specificity regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology*, 1988, 48: 211-13.

Powley TR, Opsahl CH, Cox JE, Weingarten HP, The role of the hypothalamus in energy homeostasis. In: Morgane PJ, Panksepp J, (eds) *Handbook of the hypothalamus. Part A: Behavioral Studies of the Hypothalamus*. Marcel Dekker, Inc., New York, vol 3, 211-228.

Pozzoli G, Bielzikjian L, Perrin M, Blount AL, Vale WW, Corticotropin releasing factor (CRF) and glucocorticoids modulate the expression of type 1 CRF receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology*, 1996, 137:65-71

Rabadan DC, Lolait SJ, Aguilera G, Regulation of pituitary vasopressin V1b receptor RNAM during stress in rat. *J Neuroendocrinol* 1995;7:903–10.

Rabadan-Diehl C, Kiss A, Camacho C, Aguilera G, Regulation of messenger ribonucleic acid for corticotropin releasing hormone receptor in the pituitary during stress. *Endocrinology*, 1996, 137:3808-14.

Rastam M, Anorexia Nervosa in 51 Swedish adolescents: premorbid problems and comorbidity. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1992, 31 (5): 819-29.

Redei E, Hilderbrand H, Aird F, Corticotropin releasing factor is preprothyrotropin releasing hormone (178-199). *Endocrinology*, 1995,136: 3557-3563.

Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias AC, Hogenesch JB, Gulyas J, River J, Vale WW, Sawchenko PE, Urocortin II: a member of the corticotropin releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 2843-48.

Rondeel JM, Heide R, de Greef WJ, van Toor H, van Haasteren GA, Klootwijk W, Visser TJ. Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 1992 Sep;56(3):348-53.

Roussel J-P, Hollande F, Bulant M, Astier H, A prepro-TRH connecting peptide (prepro-TRH₁₆₀₋₁₆₉) potentiates TRH- induced TSH release from rat perfused pituitaries by stimulating dihydropyridine and omega conotoxin sensitive Ca²⁺ channels. *Neuroendocrinology* 54: 559-565.

Rubin RT, O'Toole SM, Rhodes ME, Sekula LK, Czambel RK. Hypothalamo – pituitary – adrenal cortical responses to low-dose physostigmine and arginine vasopressin administration: sex differences between major depressives and matched control subjects. *Psychiatry Res* 1999;89:1–20.

Rühmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J, Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin releasing factor receptor (CRFR): developmental of CRF2 β - selective antisauvagine-30. *Biochemistry*, 1998, 95: 15264-15269.

Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Hayase M, Tsuji T, Imagawa K, Yoshima Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K, The arcuate nucleus as primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett*, 1997, 224: 149-152.

Schik RR, Samsami S, Zimmerman JP, Eberl T, Endres C, Schusdziarra V, Classen M, Effect of galanin on food intake in rats: involvement of lateral and ventromedial hypothalamic sites. *Am J Physiol*, 1993, 264: R355-R361.

Schwartz MW, Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med*, 2001, vol 221(11): 978-981

Schwartz MW, Dallman MF, Woods SC, Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *AM J Physiol*, 1995, 269: R949-R957.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfiel LA, Burn P, Baskin DG, Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*, 1996, 98: 1101.1106.

Shoebridge P, Gowers SG. Parental high concern and adolescent onset anorexia nervosa. A case-control study to investigate direction of causality. *Br J Psychiatry* 2000;176:132-7.

Schombung L, Bauer K, Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor and the TRH- degrading ectoenzyme. *Endocrinology*, 1995, 136(8): 3480-85.

Scott LV, Dinan TG, Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci*. 1998;62(22):1985-98.

Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM, Thyroid hormones regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*, 1987, 238:78-80.

Sellar RE, Taylor PL, Lamb RF, Zabavnik J, Anderson L, Edine KA, Functional expression and molecular characterization of the thyrotropin releasing hormone receptors from the rat anterior pituitary gland. *Journal of molecular endocrinology*, 1993, 10:199-206.

Seres J, Bornstein SR, Seres P, Willenberg HS, Schulte KM, Scherbaum WA, Ehrhart-Bornstein M, Corticotropin releasing hormone system in human adipose tissue, *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(2): 965-970.

Smiarowska M, Leptin and its potential role in the pathomechanism of some hormonal and metabolic disorders of patients with anorexia nervosa. *Annal Academie Medicae Stetinensis*. 2002, 48 : 351-365.

Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold HL, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee KF (1998) Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*, 1998, 20:1093–1102.

Soyka L, Misra M, Frenchman A, Miller K, Grinspoon S, Schoenfeld D, Klibanski A, Abnormal bone mineral accrual in adolescents girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87: 4177-4185.

Spina M, Merlo-Pich E, Chan R, Basso AM, Rivier J, Vale W, Appetite-Suppressing Effects of Urocortin, a CRF-Related Neuropeptide. Koob, *Science* 13 September 1996, Vol.273, no.5281, 1561-1564.

Stanley BG, Chin AS, Leibowitz SF, Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res Bull*, 1985, 14: 521-524.

Stricker EM, Zigmond MJ, Recovery of function following damage to central catecholamine – containing neurons: a model of lateral hypothalamic syndrome, In JM Sprague, AN Epstein (eds). *Progress in psychobiology and physiological psychology*, 1976, vol 6, New York, Academic press.

StØving RK, Hangaard J, Hansen- Nord M, Hagen C, A review of endocrine changes in anorexia nervosa, *Journal of Psychiatric Research*, 1999, 33: 129-152.

Sun Y, Gershengorn MC, Correlation between basal signaling and internalization of thyrotropin releasing hormone receptors: evidence of involvement of similar receptor conformations. *Endocrinology*, 2002, 143: 2886-92.

Sun Y, Lu X, Gershengorn MC, Thyrotropin releasing hormones receptors: similarities and differences. *Journal of molecular endocrinology*, 2003, 30:87-97.

Suzuki T, Kohono H, Sakadura T, Tadano T, Kisara K, Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation- induces feeding and drinking in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982, 17: 249-53.

Swachenko PE, Swanson LW, The organization and biochemical specificity of afferent projections to the paraventricular and supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Progress in Brain Research*, 1983, 60: 19-29.

Tache Y, Stephens Jr RL, Ishikawa T, Central nervous system action of TRH to influence gastrointestinal function and ulceration. *Ann NY Acad Sci*, 1989, 553: 269-285.

Takahara J, Arimura A, Schally AV, Stimulation of prolactin and growth hormone release by TRH infused into a hypophysial portal vessel. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1974, 146: 831-835.

Takahashi L, Role of CRF₁ and CRF₂ receptors in fear and anxiety. *Neuroscience and behavioral reviews*, 2001, 25:627-36.

Takahashi L, Kalin NH, Role of corticotropin releasing factor in mediating the expression of defensive behavior. In Blanchard RJ, Brain PF, Parmigiani S, editors. *Ethoexperimental approaches to the study of behavior*, Norwell, MA: Academic Publishers, 1989, 580-94.

Tchanturia K, Serpell L, Troop N, Treasure J. Perceptual illusions in eating disorders: rigid and fluctuating styles. *J Behav Ther Exp Psychiatry* 2001;32:107– 15.

Thot M, Shenk T, Antagonist mediated downregulation of 5 hydroxy tryptamine type 2 receptor gene expression: modulation of transcription. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, 45(6): 1095-1100.

Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W, Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropinreleasing hormone receptor. *Nat Genet* 1998, 19:162–166.

Tolle V, Kadem M, Bluet- Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B, Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *Endocrinology*, 2003, 88: 109-116.

Torpy DJ, Papanicolaou DA, Chrousos GP. Sexual dimorphism of the human stress response may be due to estradiol-mediated stimulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone synthesis [letter; comment]. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:982.

Uehara Y, Shimizu H, Ohtani K-I, Sato N, Mori M, Hypothalamic corticotropin releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin. *Diabetes*, 1998, 47: 890-3.

Unikel C, y Gómez G, Trastornos de la conducta alimentaria en mujeres adolescentes estudiantes de danza, secundaria y preparatoria. *Psicopatología*, 1996, Vol. 16 No. 4: 121-126.

Unikel C, Villatoro JA, Medina ME, Bautista CF, Alcántar EN y Hernández SA, Conductas alimentarias de riesgo en adolescentes mexicanos. Datos en población estudiantil de Distrito Federal. *La Revista de Investigación Clínica*, 2000, Vol. 52, No. 2: 140-146.

Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Mendez M, Covarrubias L et al., Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 1991 54 493–498.

Vale WW, River C, Brown MR, Spiess J, Koob G, Swanson L, et al., Chemical and biological characterization of corticotropin releasin factor, *Rec Prog Horm Res*, 1983; 39:245-70

Vale W, Spiess J, River C, River J, Characterization of a 41- residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotrophin and beta- endorphin. *Science*, 1981, 213: 1394- 1397.

Vargas MA, Cisneros M, Joseph-Bravo P & Charli JL. Regulation of adenohipophyseal pyroglutamyl peptidase II activity by TRH and phorbol esters. Dependence on 3,30,50,-triiodothyronine and gender. *Endocrine* 2000 13 267–272.

Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL, Thyrotropin releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology*, 1994, 60:323-330.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D, Rivier C, Rivier J, Sawchenko E, Vale W, Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor., *Nature* 378, Noviembre 1995, 287 – 292.

Van de Pol AN, Lateral hypothalamic damage and body weight regulation: role of gender, diet, and lesion placement. *The American Physiological Society*, 1982, 265-273.

Van de Pol AN, Powley T, A fine grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. *Bran Res*, 1979, 160: 307-326.

Van Haastern GA, Linkels E, Van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. Effect of long term food reduction on the hypothalamus. Pituitary thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinology* 1996 150(2): 169- 178

Van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, Bauer K, et al. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) RNAM and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol.* 1995 Apr;145(1):143-53

Viau V, Meaney MJ ¹ Adrenoreceptors mediate the stimulatory effects of oestrogen on stress-related hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the female rat. *J Neuroendocrinol*, 2004 16:72–78

Vijayan E, McCann SM, Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology*, 1977, 100:1727-30.

Vogel RA, Cooper BR, Barlow TS, Prange AJ, Mueller RA, Breese GR, Effects of thyrotropin releasing hormone on locomotor activity, operant performance and ingestive behavior. *J Pharmacol Exp Ther*, 1979, 208: 161-8.

von Bardeleben U, Holsboer F. Cortisol response to a combined examethasone/human corticotrophin-releasing hormone challenge in patients with depression. *J Neuroendocrinol* 1989;1:485 – 8.

Watts AG, Dehydration- associated anorexia: development and rapid reversal. *Physiol Behav* 1999 65: 871- 878

Watts AG, Disturbance of fluid homeostasis leads to temporally and anatomically distinct responses in the levels of neuropeptide and tyrosine hydroxylase RNAM's within the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Neuroscience*, 1992, 46: 859-879.

Watts AG, Osmotic stimulation differentially affects cellular levels of corticotropin releasing hormone and neotensin/neuromedin N RNAM's in the lateral hypothalamic area and central nucleus of the amygdala. *Brian Res*, 1992, 581: 208-216.

Watts AG, The impact of physiological stimulation on the expression on corticotropin releasing hormone and other neuropeptide genes. *Front Neuroendocrinol*, 1996, 17:281-326.

Watts AG, Sanchez- Watts G, Physiological regulation of peptide messenger RNA colocalization in the rat hypothalamic paraventricular medial parvicellular neurons. *J Comp Neurol*, 1995, 352: 501-14.

Watts AG, Sanchez- Watts G, Kelly AB, Distinct Patterns of Neuropeptide Gene Expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration- induced anorexia, *J neurosci*, 1999, 19(14): 6111- 6121

Watts AG, Sanchez- Watts G, Kelly AB, Neuropeptides and thirst: The temporal response of corticotropin- releasing hormona and neurotensin/ neuromedin N gene expression in rat limbic forebrain neurons to drinking hypertonic saline, *Behav Neurosci*, 1995, 109: 1146- 1157.

Webster CRL, *Clinical Pharmacology*, ed. Teton New Media, 2001, pag 13.

Wiersma A, Baauw AD, Bohus B, KooHLaas JM, Behavioral activation produced by CRH but not a helical CRH CRH- receptor antagonist when microinfused into the central nucleus of the amygdale under stress- free conditions. *Psychoneuroendocrinology*, 1995, 20:423-32.

Wilber JF, Utiger RD, *In vitro* studies of mechanism of action of thyrotropin releasing factor. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1968, 127: 488-490.

Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR, The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 2000, 141: 4325-28.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S, Appetite Control, *Journal of Endocrinology*, 2005, 184: 291-318.

Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott HL, Reichardt LF, Brain- derived neurotropic factor regulates energy balance downstream of melanocortin- 4 receptor. *Nature Neuroscience*, 2003, 6: 736-742.

Yang H, Tache Y, Prepro-TRH (169-169) potentiates gastric acid secretion stimulation by TRH microinjected into the dorsal motor nucleus of the vagus. *Neurosci Lett*, 1994, 174: 43-46.

Yang J, Tashjian Jr AH, Regulation of endogenous thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor messenger RNA by TRH in GH4C1 cells. *Mol Endocrinol*, 1993, 7:753-758

Yang J, Tashjian Jr AH, Transcriptional regulation by dexamethasone of endogenous thyrotropin releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary GH4C1 cells. *Endocrinology*, 1993, 133: 487-490.

Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra PS, Kalra SP, Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY- induced food intake, *Physiol Behav*, 64: 331- 338.

Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra SP, The magnocellular part of the paraventricular hypothalamus nucleus (NPV): a selective site for inhibition of NPY- induced food intake. *Physiol Behav*, 1998, 64:331-338.

Zhao D, Yang J, Jones KE, Gerald C, Suzuki Y, Hogan PG, Chin WW, Tashjian AH Jr, Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. [Erratum appears in *Endocrinology* 1993 132: 2658]. *Endocrinology*, 130: 3529-36.

Zigman JM, Elmquist JK, Minireview: from anorexia to obesity: the yin and yang of body weight control. *Endocrinology*, 2003, 144(9): 3749-3756

11.0 ANEXOS

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO
TRH Lechan et al. 1986 a	(5'-3'): GGACCTTGGTTGCTGTCTCGACTCTGGCTTTG	(5'-3'): ATGACTCCTGCTCAGGTCATCTAGAAGCT
TRH-R1 De la Peña et al. 1992	(5'-3'): ACCCAGAGAAGCAGGCAGCGTGACA	(5'-3'): GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG
CRH Jingami et al. 1985	(5'-3'): AGAAGAGAGCGCCCCTAAAC	(5'-3'): ATCAGAATCGGCTGAGGTTG
CRH-R2 Lovenberg et al. 1995	(5'-3'): TTGGCAAGGAACCTGGTGAC	(5'-3'): ACCCAGGGAAGGCTGTGAAG
CRH-R1	(5'-3'): TCCACTACATCTGAGACCATTTCAGTACA	(5'-3'): TCCTGCCACCGGCGCCACCTCTTCCGGA
PPII Schauder et al. 1994	(5'-3'): GGACACCCAAATAATTGCT	(5'-3'): CTGGATCGCATACAAAAAG
Ciclofilina Danielson et al. 1988	(5'-3'): GGGGAGAAAGGATTTGGCTA	(5'-3'): ACATGCTTGCCATCCAGCC
G3PDH Tso et al. 1985	(5'-3'): CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	(5'-3'): TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC

ANEXO 1. Secuencias de los oligonucleótidos mandados a sintetizar en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

NPV	Tm (° C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	26
CRH-R2	64	40	32
Ciclofilina y G3PDH	64	50	21
HL (BILATERAL)	Tm (° C)	pmol/μl	Ciclos
CRH	60	25	30
TRH	64	40	28
G3PDH	64	50	19
ADENOHIPOFISIS	Tm (° C)	pmol/μl	Ciclos
TRH-R1	64	25	26
PPII	55	25	30
CRH-R1	55	25	30
Ciclofilina y G3PDH	64	50	20

ANEXO 2: Ciclos y condiciones de amplificación para cada gen y cada región del cerebro analizada. Los ciclos varían dependiendo de la región del cerebro estudiada debido a que la cantidad del RNAM es diferente en cada región.

ANOVA: GRUPOS EXPERIMENTALES* GÉNERO* TIEMPO:

VARIABLE MEDIDA	F- VALUE	P- VALUE
Corticosterona sérica (ng/ml)	1.285	.2861
TSH sérico (ng/ml)	.347	.8447
T3 sérico (ng/dl)	.337	.8519
T4 sérico (ug/dl)	3.845	.0084
RNAM de proTRH (% del control)	5.316	.0102
RNAM de CRH-R2 (% del control)	7.186	.0023
RNAM de TRH-R1 (% del control)	.014	.9857
RNAM de CRH-R1 (% del control)	4.335	.0225
RNAM de PPII (% del control)	.623	.5410

Anexo 3: Tabla que representa los valores de F y P obtenidos en la ANOVA de 3 vías, comparando grupos experimentales, género y tiempo.