



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Regulación de la actividad TRHérgica en el
Sistema Nervioso Central de la rata durante el
ejercicio voluntario”**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIÓLOGA**

PRESENTA:

ELIZABETH CANDY RAMÍREZ MARTÍNEZ

TUTORA:

DRA. ROSA MARIA URIBE VILLEGAS





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos de jurado

Datos del alumno:

Ramirez
Martinez
Elizabeth Candy
22380412
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Licenciatura en Biología
300032466

Datos Tutor

Dra.
Uribe
Villegas
Rosa María

Datos sinodal 1

Dr.
Santamaría
Del Angel
Abel

Datos sinodal 2

Dr.
Guerra
Araiza
Christian
Humberto

Datos sinodal 3

Dr.
Miranda
Anaya
Manuel

Datos sinodal 4

Med. Cir.
Díaz
Zagoya
Juan Cuauhtémoc

“El trabajo endulza siempre la vida,
pero los dulces no le gustan a todo el mundo”.

Victor Hugo

“Sólo triunfa en la lucha por la vida
aquél que tiene la paciencia en sus buenos propósitos e intenciones”

Proverbio Arabe

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Rosa Maria Uribe Villegas que se financió principalmente con el donativo ***IN-212707***

Agradecimientos

En especial a la Dra. Rosa Maria Uribe Villegas que me ha ayudado mucho en mi formación profesional y personal.

Muchas gracias Rosa.

Agradezco el gran apoyo en mi formación y la colaboración técnica en las pruebas de radioinmunoensayo al QFB. Miguel Cisneros Ramírez, también al Sr. Sergio González por el apoyo recibido durante los procedimientos experimentales realizados en el bioterio del Instituto de Biotecnología.

Agradezco a la Dra. Patricia Joseph Bravo y al Dr. Jean Louis Charli, por el apoyo recibido durante mi estancia en el laboratorio.

También a muchos del laboratorio de neurobiología por su apoyo técnico y personal a José Manuel Villa, Miguel Ángel Olvera, Quim. Fidelia Romero, Dra. Antonieta Cote V y a la Sra. Elena.

Por supuesto a mis amigos: a los que han estado junto a mí por muchos años, por pocos o que han vuelto: Ing. Oscar Díaz Domínguez, Biol. Karla Juárez, Biol. Ivan Lazcano, Biol. Edgar Huerta, Lic. Sandra Ramirez, Quim. Eva Carmina, Biol. Claudia (Salazar y Velásquez), Biol. V. Hugo Herrera, Biol. Ana Sánchez Tussie y a César Hernández.

Al apoyo incondicional de los Ramírez y de los Martínez, a mis abuelos que aún me siguen enseñando, a mi Papá y mi Mamá que siempre han estado (cuando los necesito y cuando no) al igual que mis hermanos.

INDICE.

I. INTRODUCCION. 1

- 1.1 La obesidad como un problema de salud pública...1
- 1.2 Mecanismos que mantienen la homeostasis energética...3
- 1.3 El ejercicio como un modulador del gasto energético.... 6
 - 1.3.1 Las hormonas tiroideas y el gasto energético10

2. ANTECEDENTES

- 2.1 La Hormona Liberadora de Tirotropina...11
 - 2.1.1 Biosíntesis de la TRH... 12
 - 2.1.2 Regulación de la biosíntesis de la TRH... 13
 - 2.1.3 Regulación de la biosíntesis de TRH en condiciones de incremento de la demanda energética. .. 15

3. HIPOTESIS.. ..20

4. OBJETIVOS... 20

- 4.1 Objetivo general: 20
- 4.2 Objetivos particulares. 20

5. MATERIAL Y METODOS. ... 21

- 5.1 Animales. 21
- 5.2 Estrategia experimental.... 21
- 5.3 Disección. 23
- 5.4 Extracción de TRH. 24
- 5.5 Radioinmunoensayos (RIA) de la TRH en tejidos y corticosterona (B), tirotropina (TSH), prolactina (PRL) y Triyodotironina (T3) en suero.25
 - 5.5.1 Determinación de la concentración de la TRH, TSH, PRL, B y T3. ... 26
- 5.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.... 27
- 5.7 Extracción de RNA..... 28
 - 5.7.1 Cuantificación de la concentración de RNAm total.. 29

5.7.2 Obtención de cDNA a partir del RNA por transcripción reversa (RT)...	30
5.7.3 Amplificación del cDNA por PCR.	30
5.8 Análisis estadístico.	32

6. RESULTADOS. ...33

6.1 Parámetros físicos medidos en el modelo de ejercicio voluntario..	33
6.1.1 Distancia recorrida por sesión.	33
6.1.2. Monitoreo del peso corporal de los animales de los diferentes grupos experimentales. ...	33
6.1.3 Consumo de alimento en periodo de actividad y reposo.....	34
6.1.4 Determinación del consumo de agua.	35
6.1.5 Determinación del peso de grasas: parda y blanca interescapular, y epididimal. ...	36
6.2 Efecto del ejercicio voluntario sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.	37
6.2.1 Cuantificación del RNAm-TRH de NPV en ratas con 1, 3, 7 y 14 sesiones de ejercicio voluntario y los grupos intactos y sedentarios. .	37
6.2.2 Cuantificación del nivel de TRH en el HMB.....	38
6.2.3 Cuantificación de tirotrópina en suero.....	39
6.2.4 Cuantificación de Prolactina circulante.....	40
6.2.5 Cuantificación de Triyodotironina total en suero (T3).	40
6.2.6 Cuantificación de tiroxina total en suero (T4).	40
6.3 Efectos del ejercicio voluntario en diferentes parámetros del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal....	42
6.3.1 Cuantificación de RNAm-CRH de NPV en ratas con 1, 3, 7 y 14 sesiones de ejercicio voluntario.	42
6.3.2 Cuantificación de Corticosterona en suero....	43
6.3.3 Determinación del peso de la glándula adrenal en ratas ejercitadas, sedentarias e intactas.	44
6.4 Cuantificación del contenido de TRH en diferentes regiones del sistema nervioso central. ...	45
6.4.1 Regiones hipotalámicas.	45
6.4.1.1 Area preóptica. ..	45

6.4.1.2	Hipotálamo posterior.....	45
6.4.1.3	Cuerpos mamilares.	47
6.4.2	Regiones del sistema límbico....	47
6.4.2.1	Amígdala. ..	47
6.4.2.2	Hipocampo anterior.....	48
6.4.2.3	Hipocampo posterior.	48
6.4.2.4	Septum	48
6.4.2.5	Tálamo.	49
6.4.3	Acumbens.	50
6.4.4	Neurohipófisis.....	50
6.5	Núcleos del Rafe dorsal y área gris periacueductal.....	52
6.5.1	RNA _m -TRH en Núcleos del Rafe-área gris periacueductal.	52

7. DISCUSIÓN

7.1	Parámetros físicos.	54
7.2	Eje tiroideo...	56
7.3	Eje adrenal (RNA _m -CRH, corticosterona, adrenales) ...	58
7.4	Cuantificación del contenido de TRH en diferentes regiones del sistema nervioso central. ..	61
7.5	RNA _m -TRH en núcleos del Rafe y área gris periacueductal...	66

8. CONCLUSIÓN.

9. ANEXOS..

10.REFERENCIAS.....

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA OBESIDAD COMO UN PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA.

La obesidad es una de las enfermedades más antigua de la humanidad, que ha pasado de ser un trastorno metabólico a un problema de salud pública con un impacto importante en el índice de morbilidad y mortalidad (*Engeland et al 2004*).

Es un factor de riesgo importante en el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedad vesicular, osteoartritis y ciertos tipos de cánceres (*Engeland et al 2004, Bray et al 2004, Bjorge et al 2006, Bordeaux et al 2006*). Este no solo es un problema de los países industrializados, sino que también lo es en países en vías de desarrollo como el nuestro (*Zorrilla et al 2006, Villa et al 2004*).

La obesidad y las enfermedades que provoca se consideran entre las principales causas de mortalidad en México (*Villa et al 2004*). La prevalencia de obesidad y sobrepeso muestran incrementos importantes en las últimas décadas, de hecho se estima que en el año 2010 en México habrá de 8 a 14 millones de sujetos mayores de 35 años, que padecerán esta enfermedad (*Villa et al 2004*), y junto con las enfermedades que puede provocar ejercerán un marcado impacto en la calidad de vida de estas personas (*Engeland et al 2004*).

La obesidad es producida por un exceso de grasa en el cuerpo que provoca un incremento en el peso corporal, esto es generado principalmente por un desbalance en la ingesta y gasto energético del organismo. En la actualidad existen diversos tratamientos para contender con este problema, la mayoría se concentra en tratar de disminuir la ingesta de alimentos, ya sea con drogas que disminuyen el apetito, bloquean el almacenaje calórico, incrementan el gasto energético o hasta procedimientos quirúrgicos que disminuyen el tamaño del estómago (*Nisoli et al 2002, Hofbauer et al 2006, Padwal et al 2007*). Los tratamientos con drogas o dietas son generalmente paliativos, estos únicamente son efectivos cuando se mantienen indefinidamente. Recientemente se ha reconocido que la modificación del estilo de vida actual como es el mejorar los hábitos de alimentación e incrementar la actividad física, pueden jugar un papel central en la prevención y tratamiento de dicha enfermedad (*Klein et al 2004*).

Desde hace varios años existe gran interés de la comunidad científica por comprender los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la obesidad centrándose sobre todo en aquellos que regulan la ingesta de alimento, así como el balance energético.

La obesidad ocurre por desregulación de varios mecanismos metabólicos, entre ellos está el neuroendócrino en el que interviene un gran número de factores u hormonas cuyo conocimiento actual es parcial en muchos aspectos. Una de las primeras regiones cerebrales reconocidas como esenciales en el proceso del metabolismo energético es el hipotálamo; se ha definido que el núcleo ventromedial es el centro de saciedad, mientras que en el núcleo hipotalámico lateral se localiza el centro del hambre (*Abizaid et al 2006*). También se ha demostrado que el núcleo arcuato es esencial para integrar señales periféricas que modulan el control de la ingesta de alimento y el balance energético (*Xi et al 2003, Klein et al 2004, Abizaid et al 2006*). Por otro lado, el núcleo paraventricular también participa en la regulación del metabolismo energético modulando entre otras cosas al eje tiroideo que modula el gasto energético mediante la acción de las hormonas tiroideas que activan el metabolismo basal (*Karydis et al 1998, Lechan y Fekete 2006a, Lechan y Fekete 2006*).

El complejo mecanismo de la regulación de la ingesta calórica incluye impulsos tanto negativos como positivos, que engloban el grado de distensión gástrica e intestinal, los efectos de los nutrimentos y sus reservas, las consecuencias de las señales producidas en el metabolismo hepático y las producidas por los péptidos y hormonas liberados en el tracto gastrointestinal o en el cerebro. Al hipotálamo llegan diversas señales o estímulos nerviosos por vías vagales y catecolaminérgicas, y diferentes señales hormonales que se traducen a su vez, en la liberación de péptidos que afectan el apetito e influyen sobre el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipofisario (*Tremblay et al 2006*).

Recientemente, el conocimiento de como el organismo percibe variaciones en la cantidad de energía disponible ha permitido entender mejor las causas que provocan la obesidad y ha favorecido una gran disponibilidad de fármacos para el manejo de la misma, entre éstos se encuentran agentes anorexigénicos, drogas termogénicas y drogas que incrementan el metabolismo lipídico, agonistas para el receptor adrenérgico 3β , modificadores de leptina, antagonistas del receptor 1 de cannabinoides (Rimonabant); además de iniciar investigación en nuevos blancos de la farmacoterapia como sintetasas de ácidos grasos, neuropéptido Y (NPY), melanocortina, vacuna anti-ghrelina, varios péptidos reguladores del movimiento intestinal y factores ciliares neurotróficos (*Curioni et*

al 2006, Carlson et al 2006, Padwal et al 200, Hofbauer et al 2006, Palamara et al 2006). Sin embargo a pesar de existir investigación en estas farmacoterapias, a la fecha la obesidad sigue siendo una pandemia debido a varios factores que participan en el desarrollo de la misma, por ejemplo, la desregulación del balance energético, el estado anímico, y el estrés, entre otros.

1.2 MECANISMOS QUE MANTIENEN LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA

La homeostasis energética del organismo se mantiene basándose en un balance en la ingesta calórica y el gasto energético, lo que permite además establecer un equilibrio entre el peso y la cantidad de grasa corporal. Recientemente se ha establecido, la existencia de una red compleja de sistemas fisiológicos que regulan el aporte, el gasto y el almacenamiento de las reservas energéticas (*Schwartz et al 1999*).

Diversas situaciones como la ingesta, la gestación, la lactancia, la termogénesis, retos metabólicos y enfermedades, así como el ejercicio físico son procesos que determinarán el gasto energético y en última instancia afectan el peso corporal (ver referencias en *Lechan y Fekete, 2004, Overton et al 2004, Knight 2001, Hartmann et al 1998*). En mamíferos, la homeostasis energética es un compromiso entre el aporte y el gasto energético y en buena parte el equilibrio se consigue a través de la respuesta coordinada entre el sistema nervioso y el tejido adiposo, siendo este último la fuente principal de reserva energética (*Toni R. 2004*). El tejido adiposo juega un papel crucial en la regulación y la disfunción patológica del balance energético; la producción o movilización de las reservas lipídicas se lleva a cabo en función del excedente calórico procedente de la dieta o de la carencia energética (*Martínez et al 1996*).

Se han descrito varios neurotransmisores y neuromoduladores que actúan a nivel cerebral y afectan tanto al control del metabolismo energético como la ingesta; muchas de estas moléculas se ven sometidas a poderosas influencias endócrinas, sobre todo a través de la leptina, la insulina y los glucocorticoides que fluctúan según los estados fisiológicos y el ritmo circadiano (*Schwartz et al 1999*).

Numerosos estudios utilizando lesiones o la administración intracerebroventricular (icv) de agonistas y antagonistas de neurotransmisores hipotalámicos específicamente en el hipotálamo ventromedial (HVM), el núcleo paraventricular (NPV) y el hipotálamo dorsomedial (HDM), y el hipotálamo lateral (HL), han demostrado que existen circuitos

neuronales que operan a nivel del hipotálamo con el fin de regular el apetito (*Schwartz et al 1999*, ver referencias en *Abizaid et al 2006*).

Con el descubrimiento de la leptina (*Zhang et al 1994*) se comprobó la hipótesis de la existencia de un lipostato que controla la ingesta. En el modelo de esta hipótesis, el núcleo arcuato (ARC) es considerado como una región fundamental en la regulación del gasto energético por varias razones: como este núcleo se localiza en la base del hipotálamo, la barrera hematoencefálica no lo aísla de la circulación general, lo que facilita que estas neuronas sean blanco de moléculas provenientes de la circulación obteniendo así el acceso a varias señales humorales que tienen restricción de entrada a otras regiones del cerebro (*Klein et al 2004*). Estas neuronas del ARC son inervadas por axones glutamatérgicos, GABAérgicos, CRHérgicos, que están implicadas en modular la ingesta de alimentos (*Benoit et al 2000*, ver figura 1). Las neuronas del ARC responden también a fluctuaciones de señales metabólicas, como el nivel de glucosa, leptina, ácidos grasos, ghrelina e insulina; por lo que esas células se han sugerido como las neuronas sensoriales de “primer orden” (*Schwartz et al 1999*). Existe una gran cantidad de estudios donde se demuestra que las neuronas que producen la alfa-hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH) tienen actividad orexigénica y su efecto está mediado a través de receptores MC4 y MC3; estas neuronas controlan la actividad de neuronas del NPV y de neuronas del núcleo ventromedial; además estas neuronas son inmunoreactivas a ácido gama-aminobutírico o GABA (*Cowley et al 1999*, *Ramos et al 2005*). Un efecto anorexigénico lo presentan las neuronas que sintetizan al neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con la proteína agoutí (AGRP), el nivel de expresión de estos péptidos se incrementa en animales en ayuno (ver referencias en *Ramos et al 2005*), estas neuronas también envían proyecciones al NPV y al hipotálamo lateral, y hacen contactos sobre las neuronas productoras de α -MSH del mismo núcleo arcuato (*Xu et al 2003*, ver figura 1). Reportes previos sugerían que el NPY además de participar en modular el apetito también lo hacía en el balance energético, sin embargo, esto no se ha demostrado claramente. En animales genéticamente obesos i.e., ob/ob o db/db, o bien animales con un estado energético negativo por ejemplo en animales con restricción alimenticia o en animales lactantes, se encuentra incrementado considerablemente el RNAm y el péptido de NPY en el ARC (ver referencias de *Abizaid et al 2006*). El AGRP, también se sintetiza en las neuronas que producen NPY, su papel como anorexigénico lo

realiza mediante su efecto antagonista del receptor MC4 del α -MSH (ver referencias en Xu et al 2003, ver figura 11).

Las neuronas del péptido derivado de proopiomelancortina (POMC) y NPY del ARC proyectan varias a partes del cerebro como el NPV, LH y la región hipotalámicas perifornical; todas ellas tienen también receptores MC3 y MC4 (Sahm et al 1994) y Y5 y Y1 (Gerald et al 1996 y Erickson et al 1996). Las proyecciones de POMC y NPY del ARC al NPV son importantes para la regulación de neuronas que producen hormonas corticotropina y tirotrópina, y para la modulación de la actividad simpática en la regulación del metabolismo (ver referencias en Abizaid et al 2006). También hay receptores de señales nutricionales en otros núcleos hipotalámicos, entre los más notables son el VMH y LH, que además tienen un papel crítico en la homeostasis energética lo que implica que las células de estos núcleos también puedan recibir señales que les indica la demanda energética (Zigman et al 2006).

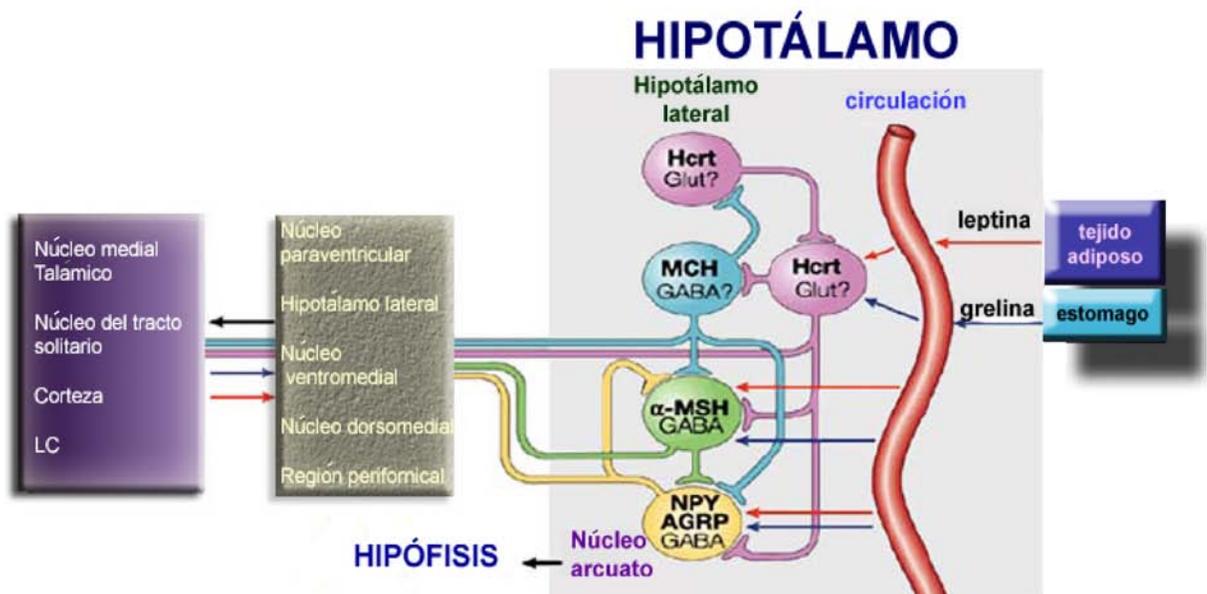


Figura 1. Relación entre regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas en la regulación de la homeostasis energética. Ilustración esquemática de las interacciones y proyecciones de diferentes sistemas peptidérgicos hipotalámicos incluyendo orexina e hipocretina (ORX/Hcrtr) y la hormona concentradora de melanina (MCH) producidas por las neuronas en el hipotálamo lateral o bien el neuropéptido Y (NPY), la proteína reguladora de Agouti (AgRP) y la hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH) producidas en neuronas del núcleo arcuato. En el hipotálamo varias hormonas periféricas incluyendo leptina y ghrelina afectan la liberación de los neuromoduladores antes mencionados. DA, dopamina; GABA, γ -ácido aminobutírico; Glut, glutamato (modificado de Abizaid et al 2006).

El VMH fue la primer región hipotalámica implicada en la regulación de la ingesta y la obesidad (*Kong et al 2004*) cuando Hetherington y Rason en los 40's, mostraron que lesiones electrolíticas de esta región en ratas, resultan en un rápido desarrollo de obesidad. Diversos análisis que incluyen lesiones químicas o estudios farmacológicos muestran que el VMH es un núcleo hipotalámico que inhibe la ingesta e incrementa el metabolismo, disminuyendo así la cantidad de grasa en el cuerpo (*Bagnasco et al 2002*). En contraste con el VMH, la destrucción del hipotálamo lateral (HL) en ratas resulta en profundos estados de anorexia, sugiriendo que el HL esta involucrado en promover la toma de comida, teniendo por lo tanto una acción orexigénica dada por diferentes neurotransmisores como MCH y glutamato que tiene influencia sobre el SNC (ver referencias de *Abizaid et al 2006* y en *Xu et al 2003*).

En los años 50's se reconoció que el comportamiento alimenticio es controlado por señales que involucran la regulación de la masa corporal a largo plazo (por ejemplo la teoría de glucostática de *Mayer en 1955*). Además de las señales transmitidas por la liberación de leptina también tienen efectos otras señales internas como la distensión gástrica la cual involucra cambios en la actividad del nervio vago o las concentraciones de hormonas en sangre de glucosa, o de hormonas como la insulina, ghrelina y colecistoquinina. Algunas de estas señales periféricas en la sangre son capaces de interactuar directamente con el sistema nervioso central ya que sus receptores se localizan en áreas donde también se encuentra el receptor de leptina; más aún, se ha reconocido que la insulina tiene efectos directos en la expresión de leptina; lo que implica consecuentemente un juego dinámico entre sistemas regulatorios a largo y corto plazo que involucran al sistema periférico y central (ver referencias en *Speakman et al 2002*).

1.3 EL EJERCICIO COMO UN MODULADOR DEL GASTO ENERGÉTICO.

El modelo de ejercicio voluntario y forzado en roedores se ha estudiado tanto en animales con peso y talla normal así como en animales obesos y la mayor parte del trabajo de investigación se ha centrado en modelos de ejercicio forzado en diferentes cepas de ratas, ratones y hámsters.

Se ha determinado que la expresión del RNA mensajero de c-Fos aumenta a partir de una hora de ejercicio forzado en la corteza cerebral, putamen, septum lateral, núcleos de la amígdala, núcleo paraventricular, núcleo dorsomedial, locus ceruleus, hipotálamo posterior, núcleos cuneiformes y médula ventrolateral (*Timofeeva et al 2003, Ichiyama et al 2002*) y dado que varias de estas regiones se activan en condiciones de estrés, aun no se han definido cuales regiones son específicamente activadas por el ejercicio, ya que se ha demostrado que el estrés puede ser un componente asociado al ejercicio forzado (*Timofeeva et al 2003*).

En animales sometidos a régimen de ejercicio se ha observado que la ingesta de alimento disminuye, se mantiene el peso corporal y se incrementa el gasto energético, manifestado por una disminución en la grasa parda y blanca (*Lewis et al 1993, Bi et al 2005, Kawaguchi et al 2005, Fediuc et al 2006*). En los animales sometidos a ejercicio forzado y voluntario, se ha observado que los núcleos arcuato, dorsomedial ventromedial y lateral del hipotálamo son activados (observándose un aumento en la expresión de CRH, POMC y NPY); dichos núcleos regulan tanto el consumo de alimento, el peso corporal y el gasto energético (*Timofeeva et al 2003, Kawaguchi et al 2005, García et al 2005, Ichiyama et al 2002*); por lo que probablemente son los responsables de los efectos inhibitorios sobre la ingesta de comida observados durante el ejercicio, efectos que se mantienen en las primeras 2 semanas de ejercicio, con una normalización subsecuente (*Kawaguchi et al 2005*). Se ha reportado que el ejercicio genera una gran variedad de cambios endócrinos y neuroendócrinos, incluyendo incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis adrenal, y de la hormona de crecimiento (GH) (*Scheen 1998, Timofeeva et al 2003, Kawaguchi et al 2005, Ichiyama et al 2002*). También el ejercicio voluntario incrementa la producción de BDNF (por sus siglas en ingles de Brain-derived neurotrophic factor) en el núcleo arcuato e hipocampo; la inducción del BDNF en el núcleo arcuato parece contribuir también en el control del peso corporal, mientras que el incremento en el hipocampo contribuye a mejorar la memoria en ratas ejercitadas (*Adlar et al 2004*).

En ratas obesas (OLEFT, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty) sometidas a ejercicio físico de alta intensidad éste repercute en una disminución en el peso corporal, nivel de glucosa y leptina en plasma comparados con animales sedentarios (*Bi et al 2005*).

El grupo del *Dr. Kawaguchi et al 2005*, ha demostrado una elevación significativa de la expresión del RNAm de CRH en el hipotálamo dorsomedial (DMH); además, la aplicación de un antagonista de los receptores de CRH en la misma región hipotalámica bloquea la

disminución en el peso corporal y en la toma de comida generada por el ejercicio, sugiriendo que el CRH del núcleo dorsomedial participa en el control de estos parámetros durante el ejercicio (*Kawaguchi et al 2005*). También se ha encontrado una expresión elevada de NPY en el DMH y en el núcleo arcuato, en el área preóptica e hipotálamo lateral (*Lewis et al 1993*), que podrían representar una respuesta compensatoria al incremento de la demanda energética resultado del ejercicio (*Kawaguchi et al 2005*). La actividad física voluntaria y el ejercicio de acondicionamiento pueden favorablemente influenciar la plasticidad cerebral facilitando procesos de neurogénesis y neuroprotección; estos procesos pueden estar mediados por factores neurotróficos como el BDNF (*Adlar et al 2004, Xu et al 2003*); la destreza motora y el ejercicio de entrenamiento aumentan funciones ejecutoras de cognición y algunos tipos de aprendizaje, incluyendo el aprendizaje motor en la médula espinal. Esas adaptaciones en el SNC tienen implicaciones en la prevención y tratamiento de la obesidad, cáncer, depresión, y en la pérdida cognitiva asociada con enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Parkinson, la demencia del alzheimer, apoplejía isquémica y lesiones en cabeza y médula espinal (*Dishman et al 2006*).

La actividad física voluntaria crónica también puede atenuar la respuesta neural al estrés en circuitos cerebrales responsables de regular la respuesta de la actividad simpática periférica; se ha sugerido también que esta restricción en la respuesta simpática al estrés puede contribuir de forma importante en la reducción de enfermedades clínicas tales como la hipertensión, estrés oxidativo y supresión inmune (ver referencias en *Dishman et al 2006*).

Durante la realización del ejercicio se requiere de energía que se obtiene de diferentes sistemas energéticos. El mecanismo de contracción y relajación del músculo es alimentado exclusivamente por ATP (de sus siglas en inglés de Adenosin trifosfato), la única forma de energía que la célula puede utilizar directamente y tiene que ser continuamente sintetizada mediante procesos metabólicos aeróbicos y anaeróbicos (*Coker et al 2005*). La síntesis aeróbica se consigue mediante la oxidación de glucosa sanguínea, derivada de las reservas de glucógeno muscular y del hígado, de los lípidos obtenidos a partir de los ácidos grasos libres circulantes, de las reservas de triacilglicerolés intramusculares y en menor medida de las proteínas. La síntesis

anaeróbica del ATP se consigue mediante la degradación de fosfocreatina a creatina y de glucosa a lactato (ver figura 2), teniendo una capacidad de síntesis total relativamente pequeña pero con un ritmo potencial mayor en comparación con el metabolismo aeróbico (Coker et al 2005).

Los ácidos grasos y triglicéridos deben activarse dentro de las células musculares antes de su oxidación para liberar energía. La Acetil CoA se forma en el citosol a partir de los ácidos grasos de cadena larga, mientras que los ácidos grasos de cadena corta se activan en la mitocondria. Una vez en la matriz de la mitocondria, los ácidos grasos experimentan la beta-oxidación, produciendo NADH y FADH₂, que transfieren electrones a la cadena de transporte para generar ATP. Además, el producto final de la mayor parte de la oxidación de los ácidos grasos la acetil CoA, pasa al ciclo de Krebs por lo que la energía potencial de la oxidación de los ácidos grasos es grande, un ejemplo de esto es la oxidación del palmitato que proporciona 129 moléculas de ATP (Ver figura 2).

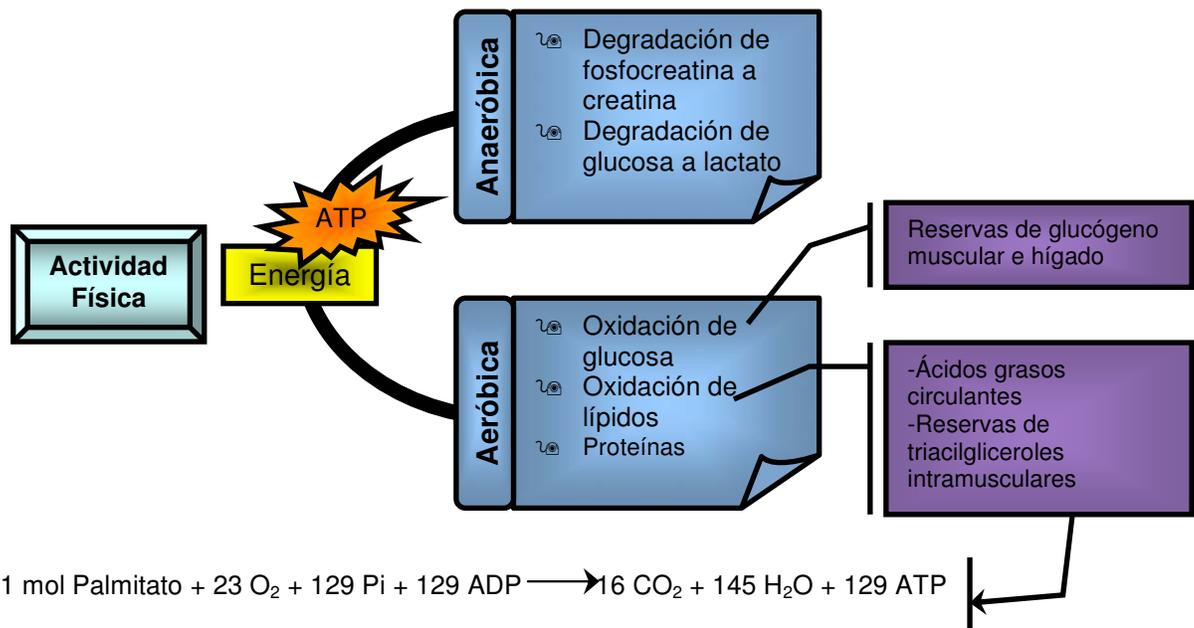


Figura 2. Obtención de energía para actividad física. La actividad física necesita de ATP que se produce por vía aeróbica y anaeróbica.

1.3.1 Las hormonas tiroideas y el gasto energético .

Las hormonas tiroideas juegan un rol importante en la regulación del gasto energético, primordialmente por sus efectos en la termogénesis basal (gasto de energía necesaria para sostener las funciones hemostáticas básicas) y en la termogénesis adaptativa (calor adicional producido en respuesta al desencadenamiento de señales que sostienen la temperatura del corazón), de hecho se ha demostrado que el gasto metabólico basal puede ser disminuido 30% en ausencia de hormonas tiroideas, y la termogénesis adaptativa en animales expuestos a frío también es marcadamente modificada (*Silva 2003, Lechan y Fekete 2006*).

Las hormonas tiroideas también tienen efectos en la lipogénesis y la regulación del apetito. La T₃ incrementa la expresión de genes que codifican para enzimas lipogénicas las cuales usan ácidos grasos derivados de tejido adiposo como primer sustrato o bien aumentan la toma de comida entre esta la enzima málica, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la acetil coenzima A descarboxilasa, ya que las inyecciones periféricas de T₃ o por la inducción de hipertiroidismo se aumenta el doble la actividad de estas enzimas en el tejido adiposo café (*Goodrige et al 1978, Bianco et al 2005, Carvalho et al 1993*); además existe evidencia de que T₃ incrementa la expresión de genes tempranos en el hipotálamo ventromedial e induce un incremento de cuatro veces la toma de comida cuando es inyectada directamente en esta región hipotalámica (*Kong et al 2004*).

La T₃ también inhibe la síntesis de leptina, esto se observa en cultivos primarios de tejido adiposo (blanco y pardo) e *in vivo* en animales administrados con dosis sistémicas de T₃ (*Ishii et al 2003, Medina-Gómez et al 2004*), proponiendo un mecanismo alternativo mediante el cual T₃ puede incrementar el apetito y se ha postulado que los efectos de T₃ en la lipogénesis y la toma de comida son compensatorios (*Silva 2005*).

2. ANTECEDENTES

2.1 LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) fue la primer hormona hipofisiotrópica purificada y caracterizada (*Guillemin et al 1970*). La TRH es un tripéptido derivado de un precursor protéico de 26kD, en su forma activa tiene una secuencia piroglutamil-histidil-prolin-amida (pGlu-His-Pro-NH₂) que es sintetizado en varias regiones del hipotálamo como el área preóptica, el anterior, el lateral, los cuerpos mamilares, dorsomedial, supraóptico, supraquiasmático, y en el paraventricular (NPV) donde se presenta una mayor concentración. También se sintetiza en otras regiones del SNC como la amígdala, el hipocampo, el bulbo olfatorio, el núcleo reticular talámico, los núcleos del Rafe (*Segerson et al 1987*) así como en páncreas, intestino, corazón, próstata, ovarios y testículos (*Jackson et al 1983, Wilber et al 1998*).

La TRH en su forma de péptido activo liberada de la eminencia media regula la síntesis y secreción de la tirotrópina (TSH) de la adenohipófisis la cual produce la secreción de la triyodotironina y tiroxina en la tiroides; además induce la síntesis y liberación de prolactina (PRL) la cual entre otras funciones esta encargada de la secreción de leche (*Haisendeder et al 1992*), en condiciones patológicas la TRH también provoca la liberación de la hormona de crecimiento (GH) (*Harvey et al 1990*).

Debido a la amplia distribución de la TRH en el SNC se ha propuesto que participa como neuromodulador en el SNC. En la tabla 1 se resumen algunas de las actividades en las que se ha involucrado a la TRH cuando se aplica en forma exógena (*García et al 2005, Chen et al 1999, Gutiérrez 2005*).

Efecto	Descripción	Referencias
Hipertensión	Microinyecciones icv de 3 ng TRH en área preóptica (involucrada en la función cardiovascular) aumenta la presión arterial y la velocidad del corazón.	<i>Sharif NA 1985</i> <i>Silva et al 2005</i>
Actividad locomotora	La administración de TRH y análogos en núcleo acumbens, septum y estriado incrementan la actividad locomotora	<i>Sharp et al 1984</i>
Modula la ingesta de comida y agua	Administración periférica de TRH en ratas inhibe la toma de comida y agua, también la aplicación central reduce el consumo de agua.	<i>Al-Arabi et al 2003</i> <i>Susuki et al 1982</i> <i>Vogel et al 1979</i>
Termogénesis	Inyecciones icv e intraperitoneales de TRH aumentan de temperatura corporal.	<i>Boschi et al 1981</i> <i>Shintani et al 2005</i>

Tabla 1. Efectos no hipofisiotróficos de la TRH

2.1.1 Biosíntesis de la TRH

La unidad transcripcional del gen de la TRH corresponde a un gen único, cuyo DNAC se ha descrito en humano, rata, rana, ratón y pollo (*Richter et al 1984, Jackson et al 1983, Cao et al 1998, Vandenborne et al 2005*). Está compuesto de tres exones: el primero codifica para la región 5' no traducida del RNAm, el segundo codifica para el péptido señal y una parte del amino terminal del precursor peptídico, el tercero codifica para las 5 secuencias repetidas de *gln-his-pro-gly* y el extremo 3' no traducido del RNAm. En la rata la región promotora de esta secuencia está comprendida entre -547 y +84 (*Pérez-Martinez et al 1999*), la región promotora 5' del gen de TRH de rata contiene la caja TATA (-29pb) y un elemento de respuesta a SPI: SPIRE, dos elementos de respuesta al factor de crecimiento epidermal, dos secuencias de unión al elemento de respuesta a

AMPC, el factor de transcripción AP1 compuesto por un dímero proteico (c-fos y c-jun), dos elementos de respuesta a los receptores de hormonas tiroideas, así como cuatro elementos de respuesta a los receptores de glucocorticoides, dos secuencias con homología a una secuencia presente en la región promotora del gen del péptido natriurético auricular, que confiere expresión específica y es homóloga al elemento de respuesta del suero y una secuencia homóloga a un *enhancer* neuronal (ver referencias en *Pérez-Martínez et al 1999*).

La TRH se origina a partir de un transcrito sintetizado en el núcleo celular, el cual es transportado al citoplasma para ser traducido por los ribosomas cercanos al retículo endoplásmico rugoso (RER), generándose un precursor peptídico (preproTRH) de 26 kd. El preproTRH es internalizado en forma cotraduccional al RER a través de su péptido señal el cual se elimina durante este proceso, generándose el pro-TRH. Posteriormente, éste es transportado en vesículas de transporte al Aparato de Golgi donde inicia el procesamiento del proTRH por las enzimas de procesamiento o convertasas PC1 y/o PC2, los productos del procesamiento inicial son empaquetados en vesículas de secreción junto con las convertasas, la peptidilglicina α -amida monooxigenasa (PAM) y la glutaminil ciclasa, las cuales se encargan de modificar los extremos amino y carboxilo de la TRH activa. Las vesículas de secreción son transportadas por el sistema de microtúbulos del axón al sitio de liberación del péptido activo (*Murdoch et al 1983, Nillni et al 1999*).

2.1.2 Regulación de la biosíntesis de la TRH

Bajo diferentes condiciones fisiológicas y experimentales las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo modifican la tasa de síntesis y liberación de la TRH, tales como: la lactancia, el ciclo estral, el ciclo circadiano, tiroidectomía, adrenalectomía, estrés entre otras (*Segerson et al 1987, Arancibia et al 1983, Tsigos et al 2002, Smith et al 1995, Covarrubias et al 1988*).

Se ha demostrado que éstas neuronas TRHérgicas del NPV reciben inervaciones nerviosas provenientes de varias áreas del cerebro que son inmunoreactivas a neuropéptido Y (*Broberger et al 2005*), CRH, o GABA, Glutamato, serotonina, noradrenalina (*Mitsuma et al 1987, Stocca et al 1996, al-Damluji et al 1993*), el péptido relacionado con la proteína agouti (AGRP) (*Fekete et al 2002, α MSH*) y un transcrito

regulado por anfetamina y cocaína (CART) (*Fekete et al 2005, MCH*) y además expresan a receptores intracelulares como el de hormonas tiroideas y de glucocorticoides (*Kakucska et al 1992, Lee et al 1996*).

Las hormonas tiroideas ejercen un control de retroalimentación negativa sobre el nivel del RNAm de la TRH y la TSH a nivel del hipotálamo y la hipófisis, respectivamente. Esta regulación solo ocurre en el NPV y los núcleos del rafe, sugiriendo que es mediante el receptor β para hormonas tiroideas (*Wu et al 2000, Yang et al 1999*). En animales adrenalectomizados se observó un incremento del RNAm de la TRH en el NPV lo que sugirió que los glucocorticoides regulan negativamente su biosíntesis en dicha región hipotalámica (*van Haasteren et al 1995*). Sin embargo, experimentos *in vitro*, han reportado que los glucocorticoides estimulan la síntesis del RNAm de TRH (*Pérez-Martinez et al 1999*). Durante la lactancia el nivel de RNAm de TRH en las neuronas del NPV de la rata disminuyó al quinto día de lactancia comparativamente con los niveles en el día 18 de gestación y el día de parto; debido a que las variaciones en el RNAm del TRH presentaron un efecto opuesto al de la corticosterona circulante y a que las hormonas tiroideas se encontraban disminuidas durante toda la lactancia, se propuso que los glucocorticoides debían ser responsables de inhibir la síntesis del RNAm de la TRH en esta condición (*Uribe et al 1995*). Durante la lactancia, las neuronas TRHérgicas presentan otra respuesta generada por la succión de la glándula mamaria de la madre inducida por las crías en la cual a pesar de la disminución que existe en el nivel de RNAm, este estímulo induce un aumento transitorio en el RNAm de TRH en el NPV a la par que se incrementa el nivel de corticosterona en sangre (*Uribe et al 1993*).

Por otra parte, en condiciones de exposición al frío se ha observado la estimulación del eje tiroideo, ya que se observa un incremento rápido en el nivel de RNAm de TRH en neuronas hipofisiotrópicas del NPV (*Arancibia et al 1983, Uribe et al 1993*), también existe un incremento en la secreción de TRH en los capilares de los axones terminales de la eminencia media (*Rondeel et al 1991*) que puede ser abolido con antisuero de TRH o por ablación del NPV (*Ishikawa et al 1984*) y además hay un aumento en el contenido de TSH en plasma (*Rondeel et al 1991*); las catecolaminas aparentemente son esenciales para esta respuesta a la exposición al frío donde se incrementa la concentración hipotalámica de adrenalina y noradrenalina en perfusión “push-pull” (*Rondeel et al 1991*), mientras que la depleción de catecolaminas desaparece la activación del eje HHT en esta

condición (*Arancibia et al 1989*); por lo que se ha propuesto a los receptores α -adrenérgicos como los responsables de modular la liberación de TRH durante esta condición (*Arancibia et al 1989*). A diferencia de lo observado en el estrés por frío, en otro modelo de estrés psicológico como es la inmovilización, el RNAm de TRH disminuye después de 0.5-2h de la restricción (*García 2006*). El estrés induce la expresión de la neurotrofina BDNF en las neuronas TRHérgicas del NPV y en condiciones *in vitro* claramente se ha demostrado que el BDNF aumenta la expresión del gene de TRH. Durante la endotoxemia, condición en la cual la demanda energética es elevada, así como el nivel de corticosterona en suero, también la síntesis del RNAm de TRH se disminuye en el NPV (*Brackett et al 1990*). Con base en estas evidencias, podemos observar que la biosíntesis de TRH neuronas TRHérgicas del NPV se regula en condiciones de alteración metabólica del organismo y su respuesta se adecua en función de los requerimientos energéticos del mismo. Aun no se ha demostrado si el TRH participa como un modulador del gasto energético o bien si su síntesis y liberación se adecuan a la demanda del gasto energético requerido en cada condición metabólica.

2.1.3 Regulación de la biosíntesis de TRH en condiciones de incremento de la demanda energética.

La TRH tiene un importante rol en la regulación de la homeostasis energética, principalmente porque modula la función tiroidea orquestada por neuronas hipofisiotrópicas en el núcleo paraventricular, además de que se han reportado efectos centrales de la TRH en el comportamiento alimenticio, la termogénesis, la activación locomotora y la regulación autonómica (*Joseph-Bravo 2004, Lechan and Fekete 2006, Jaimes 2006*)

Las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas localizadas en la subdivisión medial y parvocelular del NPV disminuyen su concentración del RNAm de la TRH durante el ayuno; esta respuesta sobre la biosíntesis de la TRH no parece ser producida por un efecto de las hormonas tiroideas, ya que éstas se encuentran disminuidas en la sangre (*van Haasteren et al 1995*). También se ha demostrado que los glucocorticoides regulan parcialmente el efecto del ayuno sobre la biosíntesis de la TRH, ya que en ratas adrenalectomizadas se bloquea parcialmente el decremento en el nivel de RNAm de TRH en respuesta a la privación de alimento (*Sheppard et al 1998*). No solo los

glucocorticoides participan en esta condición, ya que como se mencionó, la ingesta de alimento en los mamíferos está estrictamente regulada por una variedad de estímulos periféricos y nerviosos (ver figura 3) que se originan del tracto gastrointestinal (colecistoquinina, ghrelina), páncreas (insulina), tejido adiposo (leptina); y de los núcleos hipotalámicos (arcuato, dorsomedial, lateral y ventromedial) los cuales convergen sobre las neuronas TRHérgicas del NPV regulando su actividad metabólica en ayuno (*Fekete et al 2002, Popovic et al 2005*).

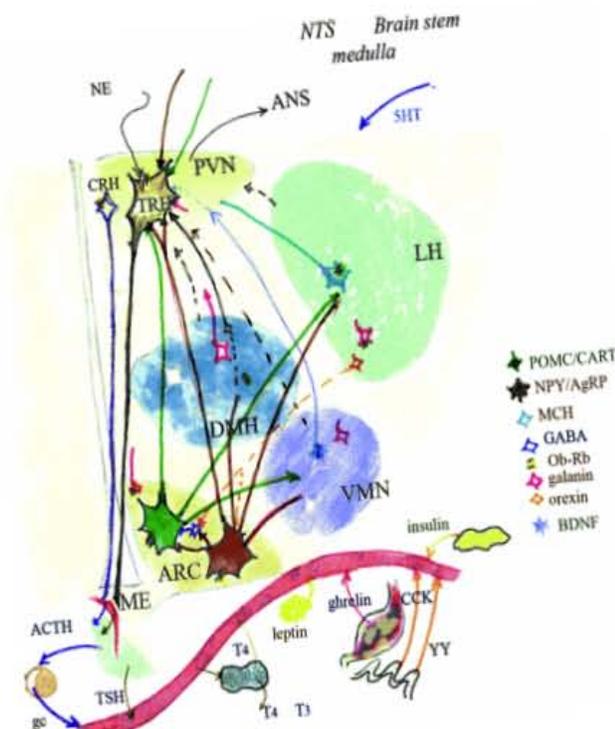


Figura 3. Representación esquemática de las señales más importantes involucradas en la homeostasis energética. Orexigénicas (café), anorexigénico (verde) eferentes del núcleo arcuato (ARC) al NPV, el hipotálamo lateral (LH), núcleo ventromedial (VMN), e hipotálamo. ANS, Sistema nervioso autónomo, BDNF factor neurotrófico derivado del cerebro; CCK, colecistoquinina, gc, glucocorticoides; ME, eminencia media; NE, noradrenalina; NTS, núcleo del tracto; Ob-Rb, receptor de leptina; YY, péptido YY; 5HT, serotonina. Líneas continuas representan circuitos bien caracterizados y líneas discontinuas posibles reguladores (Tomado de Joseph-Bravo, 2004)

La mayoría de las proyecciones de las neuronas TRHérgicas del NPV van dirigidas al núcleo arcuato hipotalámico y se ha sugerido que fisiológicamente la interacción entre estas regiones puede ser el mecanismo primario para el desarrollo de hipotiroidismo central asociado con el ayuno, por la expresión de diferentes péptidos (α -MSH/CART y AGRP/NPY) que es mediado por la circulación de leptina (*Ahima et al 1996, Legradi et al 1997, Lechan y Fekete 2004*). Durante las insuficiencias nutricionales, como ocurre en el ayuno la secreción de leptina disminuye induciendo la ingesta, además en esta condición se ha observado la caída en los niveles de hormona tiroidea en sangre periférica, una reducción del RNAm de TRH en el NPV, en la secreción de TRH y TSH en el torrente sanguíneo (ver referencias en *Lechan et al 2006*).

Se ha reportado que si la leptina es administrada vía sistémica o centralmente en animales en ayuno se previene la reducción en los niveles circulantes de hormonas tiroideas, TSH y RNAm-TRH en el núcleo paraventricular (*Ahima et al 1996, Legradi et al 1997*), también se sabe que la leptina puede incrementar la expresión de proTRH en algunas neuronas del núcleo paraventricular (*Legradi et al 1997*). Recientemente se ha reportado a la leptina como regulador de la expresión de las convertasas PC1 y PC2 las cuales son esenciales para la maduración del precursor del TRH, ya que en condiciones de ayuno al administrar leptina se incrementa la acción de las convertasas comparando con animales en la misma condición en donde disminuye la acción (*Nilaweera et al 2003*).

CART (Cocain Amphetamin Regulated Transcript) es co-localizado en aproximadamente 50% de las axones catecolaminérgicos en contacto con neuronas TRHérgicas en el NPV (*Wittmann et al 2004*), y este incrementa la expresión génica de TRH en el NPV (*Fekete et al 2000*) y la acumulación de monoaminas en varias regiones del cerebro (*Vaarmann y Kask 2001*), CART también puede contribuir a la activación del eje HHT durante la exposición al frío por efectos directos en las neuronas TRHérgicas o por la potenciación de la secreción catecolaminérgica (*Wittmann et al 2004*).

Cuando es administrado icv α -MSH y CART tiene potentes efectos para restaurar la supresión del contenido del RNAm-TRH en neuronas hipofisiotrópicas durante el ayuno

(Fekete et al 2000). Además, datos de estudios *in vitro* muestran que α -MSH y CART no solo incrementan la expresión génica de TRH, sino que también incrementan la liberación de TRH de rebanadas hipotalámicas y de cultivos hipotalámicos (Fekete et al 2000, Kim et al 2000 y Nillni et al 2000).

AGRP y NPY tienen potentes efectos inhibitorios en la síntesis del TRH en las neuronas hipofisiotrópicas (Fekete et al 2002). Cuando alguno de estos péptidos es administrado *icv* en animales con alimentación *ad libitum* genera un estado de hipotiroidismo que es estrechamente comparable con lo observado en animales en ayuno (Fekete et al 2001). La continua administración de AGRP *icv*, provoca una reducción de más del 60% del RNAm-TRH en neuronas hipofisiotrópicas y aproximadamente un 50% en la circulación de hormonas tiroideas, del mismo modo la administración de NPY reduce 55% el RNAm-TRH y los niveles de las hormonas tiroideas circulantes (Fekete et al 2001). Los efectos inhibitorios de AGRP en la expresión génica del TRH es resultado de la activación antagonista de α -MSH a los receptores de melanocortina (Haskell-Luevano y Monck 2001), también se ha sugerido la posibilidad de que AGRP puede también unirse a otros receptores de melanocortina (Hagan et al 2000). Por otra parte los efectos inhibitorios de NPY en la expresión génica de TRH son mediados a través de los receptores Y1 y Y5 (Fekete et al 2002), ambos receptores son acoplados a proteínas G y uno de los posibles mecanismos para esta inhibición en la expresión génica de TRH es la reducción de pCREB en el núcleo de las neuronas TRHérgicas; esta disminución en la respuesta se ha demostrado en animales pretratados con NPY y con una posterior administración de α -MSH, observándose una reducción del 40% de neuronas TRHérgicas que contienen pCREB en su núcleo comparado con animales tratados con α -MSH y pretratados con hormona somatomatotrófica carionica (CSH) artificial (Sarkar y Lechan 2003, ver referencias en Fekete y Lechan 2006).

La TRH tiene acción anorexigénica; la administración central o periférica de TRH (5 μ g/h) o análogos de TRH reducen consistentemente la toma de alimentos (Horita et al 1998; Steward et al 2003, Al-Arabi y Andrews 2003), esta reducción en la toma de comida se ha observado en animales con alimentación *ad libitum*, en animales que han sido sujetos a ayuno con reintroducción de comida y con en condiciones de estrés alimenticio; en este

último modelo se ha demostrado que el efecto no es dependiente de catecolaminas, ya que la depleción de catecolaminas en el cerebro con 6-hidroxidopamina no bloquea esta acción del TRH sobre la reducción de la ingesta (*Vogel et al 1979*). El *locus* preciso del efecto anoréxico de la TRH aún se desconoce, pero inyecciones directas de TRH en el hipotálamo medial y núcleo acumbens hace que se presente este efecto anorexigénico (*Susuki et al 1982*).

Estudios realizados por *Kelley et al (2004)* han demostrado que el núcleo acumbens y el núcleo central de la amígdala están involucrados en el control de la toma de alimentos y su funcionamiento es parte crítica entre circuitos corticales y circuitos hipotálamo/tallo cerebral. La amígdala está densamente innervada por axones TRHérgicos provenientes del hipotálamo principalmente (*Lechan et al 1987*) y tienen un rol importante en el control y consumo de comida (*Kelley et al 2004*).

Por otra parte se ha demostrado que la activación de aferentes vagales de TRH del tallo cerebral juegan un papel crítico en el control de la toma de comida; ya que la acción orexigénica del TRH en el tallo cerebral es mediada por estimulación vagal-colinérgica de la liberación de ghrelina gástrica (*Ao et al 2006*) ya que inyecciones de análogos de TRH induce un incremento en los niveles de ghrelina en suero y un pretratamiento periférico con antagonistas del receptor de ghrelina o con atropina eliminan por completo el aumento en la toma de comida inducido por el análogo de TRH (*Ao et al 2006*).

3. HIPOTESIS.

Si la TRH juega un papel importante en la regulación de la homeostasis energética por sus efectos en la función tiroidea y en el comportamiento alimenticio, la termogénesis, la actividad locomotora y la regulación autonómica, entonces en un regimen de ejercicio voluntario donde se observan efectos en todas estas funciones podría modular la actividad de las neuronas TRHérgicas en algunas regiones del SNC.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar si el incremento en el gasto energético regula la actividad de las neuronas TRHérgicas en regiones involucradas en la homeostasis energética.

4.2 Objetivos particulares

- ④ Monitorear la actividad del eje hipotálamo hipófisis tiroides y adrenal durante el ejercicio voluntario.
- ④ Definir si existen cambios en la concentración de TRH en diferentes regiones del sistema nervioso central durante el ejercicio voluntario.
- ④ Medir si el ejercicio voluntario modula el nivel de RNAm-TRH en el tallo cerebral.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 2 a 3 meses de edad (con un peso entre 250 y 300g), mantenidos en periodo de luz y oscuridad de 12-12 horas, con temperatura controlada de 21 a 24°C; agua y alimento *ad libitum*.

En este procedimiento experimental utilizamos 3 grupos de ratas (5-6 ratas por grupo): un grupo de ratas ejercitadas y dos grupos controles: sedentarias e intactas. El experimento se llevó a cabo en el periodo de actividad de las ratas (ver figura 4).

5.2 Estrategia experimental.

Las ratas ejercitadas se colocaron en una caja de acrílico provista de una rueda giratoria (diámetro de 0.245m) con un contador de giros integrado durante el periodo de actividad de ~12 horas (de 18:30 y se retiraban a las 8 a.m.) durante 1, 3, 7 y 14 días; las ratas sedentarias, también se colocaron en cajas individuales durante el periodo de actividad y se colocaron en grupo al mismo tiempo que las ejercitadas, mientras que las intactas estuvieron en grupos todo el tiempo (ver figura 4).

El peso de las ratas, el consumo de agua y de alimento (en periodo de actividad y de reposo) fue medido cada dos días, mientras que la distancia recorrida por cada rata se registró diariamente.

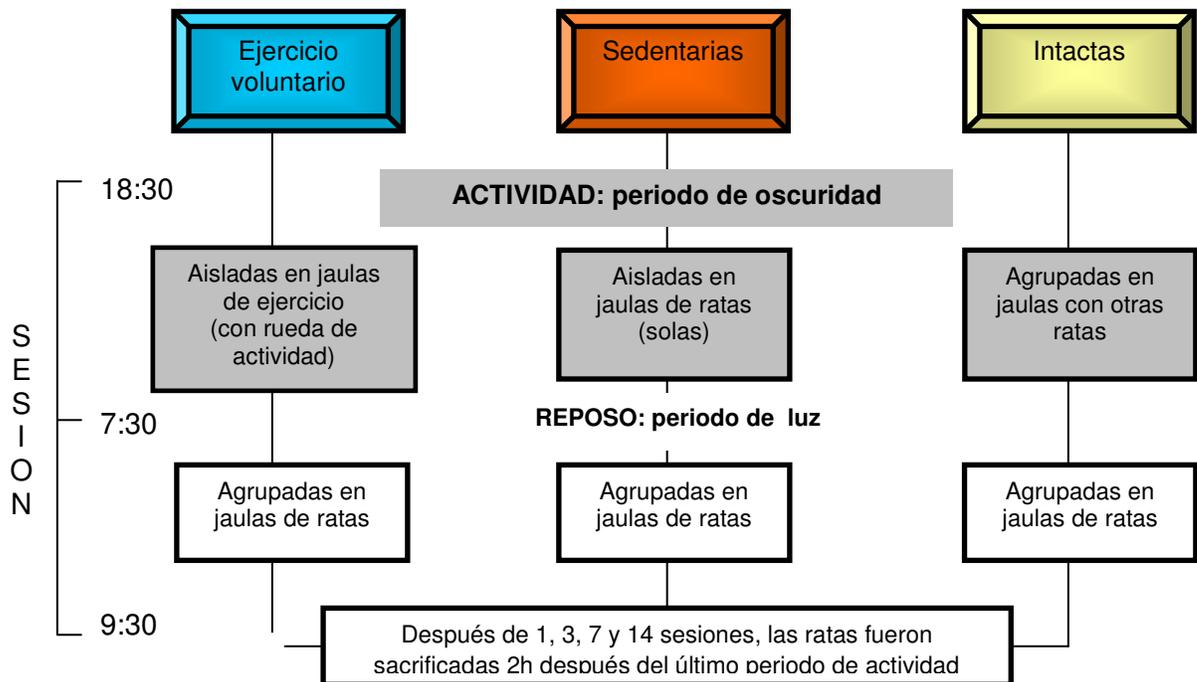


Figura 4. Diagrama del protocolo experimental utilizado en este trabajo. Distribución de los grupos experimentales durante el periodo de actividad y reposo.

Dos horas después del último periodo de actividad, todos los animales fueron sacrificados por decapitación, en un lapso no mayor a 2 horas; disecamos los cerebros e inmediatamente se obtuvo: el hipotálamo medio basal, la hipófisis dividida en el lóbulo anterior y el lóbulo neurointermedio. Todos los tejidos fueron congelados en hielo seco y mantenidos a -70°C para subsecuentes análisis de TRH y el RNAm de TRH y CRH.

Durante el sacrificio también se obtuvo el peso de la grasa parda y blanca interescapular y en algunos casos la epididimal, las glándulas adrenales por separado en glándula izquierda y glándula derecha. También se recolectó sangre de donde se obtuvo el suero al centrifugar las muestras a 2500rpm durante 30 min. (Beckman Model TJ-6, rotor 74mm) y después se mantuvo congelado a -20°C para posterior cuantificación de T3, TSH, corticosterona y prolactina.

5.3 Disección.

Disecamos los cerebros semicongelados con una navaja tipo *Gillette* para obtener rebanadas transversales de diferente grosor para su posterior extracción con sacabocados de diferentes medidas en regiones específicas del SNC, se obtuvieron y procesaron de forma independiente el lado derecho del izquierdo: septum, acumbens, área preóptica, hipotálamo posterior (hipotálamo ventromedial y dorsomedial), núcleos mamilares, amígdala, hipocampo anterior e hipocampo posterior y tálamo; mientras que el área de núcleo paraventricular y núcleos del rafe no se dividieron. Todas las disecciones se hicieron tomando como referencia el atlas de *Palkovits et al 1988* (ver figura 5).

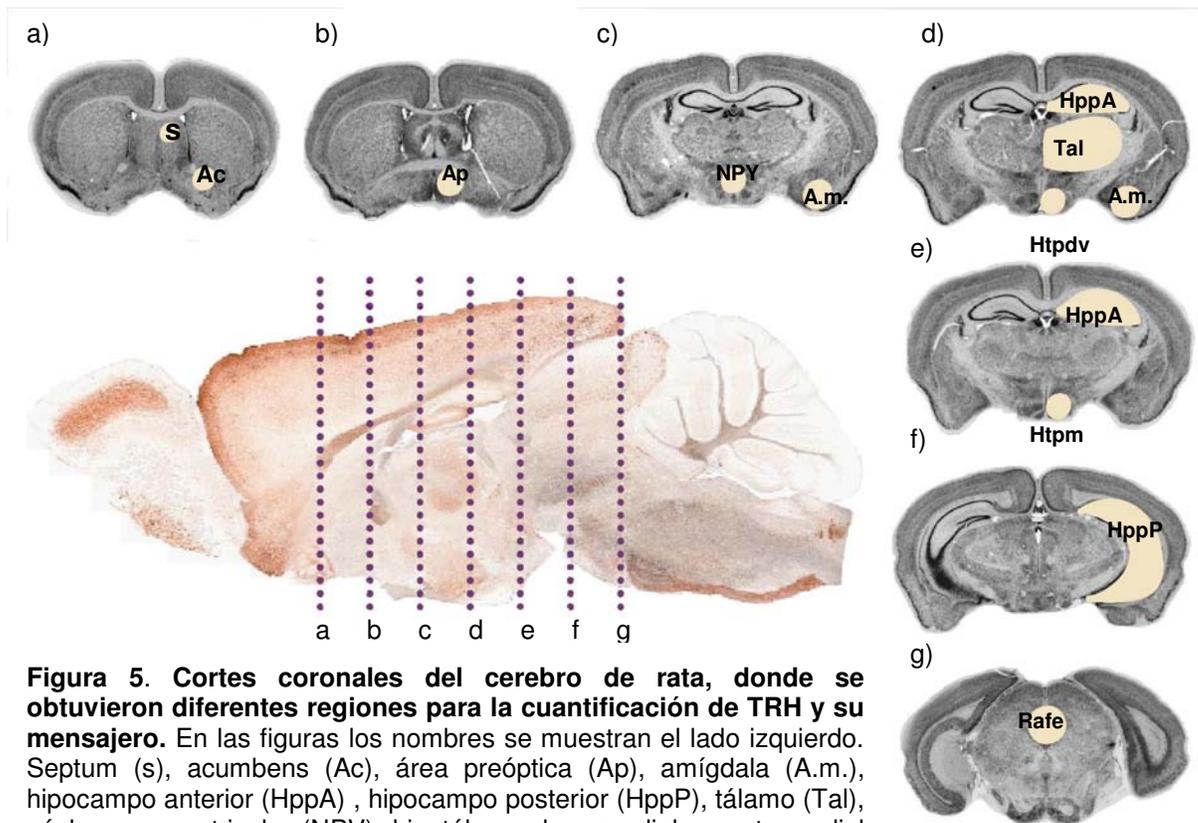


Figura 5. Cortes coronales del cerebro de rata, donde se obtuvieron diferentes regiones para la cuantificación de TRH y su mensajero. En las figuras los nombres se muestran el lado izquierdo. Septum (s), acumbens (Ac), área preóptica (Ap), amígdala (A.m.), hipocampo anterior (HppA), hipocampo posterior (HppP), tálamo (Tal), núcleo paraventricular (NPV), hipotálamo dorsomedial y ventromedial (Htpdv), Cuerpos mamilares (Htpm).

5.4 Extracción de TRH

A los tejidos se les agregó ácido acético al 20% en una proporción de 10% (P/V) y se homogenizaron con un sonicador (Ultrasonic homogenizer 4710) de 10-15 seg. (ver tabla 1), se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos (Centrifuga Jouan MR1822 rotor de radio 83mm) se recuperó el sobrenadante, de éste se generaron dos alicuotas una para TRH y otra para proteína, la fracción de TRH se evaporó a sequedad; posteriormente se agregó 1ml de metanol al 90% y se dejó a -20°C por toda la noche. Después se centrifugaron a 10,000rpm durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se dejó secar para posteriormente cuantificar TRH por radioinmunoensayo. En la otra alicuota (ver tabla 2) se cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford (BioRad).

Región	Ac. Acético (μl)	Alicuota para medir TRH (μl)	Alicuota para medir Proteína (μl)	Fracción de Buffer con TRH utilizado para medir por RIA
S	300	230	40	2/6
Ac	500	420	50	2/6
Ap	500	420	50	1/3
Htpdv	500	420	50	1/3
Htpm	500	420	50	1/3
A.m.	800	700	70	2/6
HppA	800	700	70	2/6
HppP	1200	1000	100	2/6
Tal	1200	1100	50	2/6
HMB	300	230	50	1/3
LNI	300	230	50	1

Tabla 2. Volúmenes utilizados en la extracción y cuantificación de TRH en diferentes regiones. Extracción de TRH en diferentes regiones del Sistema Nervioso Central. Septum (S), Acumbens (Ac), Área preóptica (Ap), Hipotálamo dorsomedial y ventromedial (Htpdv), Cuerpos mamilares (Htpm), Amígdala (A.m.), Hipocampo anterior (HppA), Hipocampo posterior (HppP), Tálamo (Tal), Hipotálamo Medio basal (HMB), Lóbulo neurointermedio (LNI).

5.5 Radioinmunoensayos (RIA): de TRH en tejidos del SNC, corticosterona (B), tirotropina (TSH), prolactina (PRL) y Triyodotironina (T3) en suero.

El *radioinmunoensayo* (RIA) se basa en la competencia que se establece, para unirse a un anticuerpo policlonal, entre la sustancia a cuantificar y cantidades fijas de la hormona marcada con un isótopo. Al establecerse esta “competencia” resulta que a mayor cantidad de hormona, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une al anticuerpo y viceversa.

Los resultados se obtienen al medir la radiactividad de la hormona marcada unida al anticuerpo ó de la hormona marcada libre mediante un contador de radiaciones. Una vez medida la radiactividad de cada tubo se construye una curva con los resultados obtenidos con cantidades conocidas de hormona sin marcar y marcada. A esta curva se interpolan los valores obtenidos de los sueros problema y se obtiene la concentración de la hormona no marcada a investigar.

La descripción de la preparación de cada ensayo esta en la tabla 3 y fue realizado según lo publicado en *Méndez et al 1987*. En cada uno de los ensayos se realizaron controles: Cuentas por minuto (cpm) totales (T), unión no específica (NSB) y unión en ausencia de la hormona fría (B0). Una curva estándar por triplicado que consistió en 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000pg de TRH, TSH, B y PRL, y para T3 fue 20, 50, 100, 200 y 600ng/dl, en 100µl de buffer de RIA para T3 (Kit C) y TRH, 200µl para TSH y PRL, y en 500µl de buffer diluyente de esteroides (fosfato de sodio 10mM, pH 7.5, cloruro de sodio 150 mM y gelatina 0.1%) para el caso de corticosterona (según lo reportado por ICN). Todas las muestras se cuantificaron por duplicado (ver tabla 3).

Después de añadir el anticuerpo, las muestras de TSH, PRL y T3 se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, después se adicionó la hormona marcada y se incubó por 24 h más, las muestras de TRH solo se incubaron a 4°C de 36 a 48 h y las de T3 por 12h a 4°C. Posteriormente el complejo antígeno/anticuerpo se precipitó agregando 1ml de etanol absoluto frío (TRH) más 100µl de anticuerpo IgG al 2.5% , 100µl de suero normal de conejo al 2% y 1ml de polietilenglicol 4% (TSH) o 100µl de γ -globulina bovina

0.5% y 500µl de polietilenglicol al 20% (PRL) o 200µl de carbón dextrán (B) y por centrifugación a 5000rpm por 30 min; para la T3 el complejo se incubó durante 2h a 37°C en baño de agua para inducir que el complejo se pegue a las paredes del tubo. Por último se aspiró el sobrenadante (para T3 solo se decantaron los tubos) y el complejo antígeno-anticuerpo precipitado se cuantificó en un contador gamma (LKB-Wallac, 1275) para la TRH, TSH, T3 y PRL o en un contador beta (LS-60001C, Beckman) usando líquido de centello para la corticosterona.

RIA	CPM totales	NSB unión no específica	B0	Muestras	Buffer RIA
TRH	100µl TRH-I ¹²⁵ (5,000cp m)	100µl TRH-I ¹²⁵ 200µl buffer RIA	100µl TRH-I ¹²⁵ 100µl buffer RIA 100µl anticuerpo anti-TRH (1:10,000)	100µl de muestra 100µl TRH-I ¹²⁵ 100µl anticuerpo anti-TRH (1:10,000)	50mM PO ₄ pH 7.5 150mM NaCl 0.25% BSA
B	100µl B-H ³ (10,000cp m)	100µl B-H ³ 600µl buffer RIA	100µl B-H ³ 500µl buffer RIA 100µl anticuerpo anti-B (1:1,200)	500µl suero (1:500) desnaturalizado a 98°C por 10min. 100µl B-H ³ 100µl anticuerpo anti-B (1:1,200)	10mM PO ₄ pH 7.5 150mM NaCl 0.1% Gelatina de piel de becerro
TSH	100µl TSH-I ¹²⁵ (10,000cp m)	100µl TSH-I ¹²⁵ 300µl buffer RIA	100µl TSH-I ¹²⁵ 200µl buffer RIA 100µl anticuerpo anti-TSH (1:375,000)	50µl suero 100µl TSH-I ¹²⁵ 100µl anticuerpo anti-TSH (1:375,000) 50µl buffer RIA	50mM PO ₄ pH 7.5 150mM NaCl 1 %BSA 50mM EDTA
PRL	100µl PRL-I ¹²⁵ (10,000cp m)	100µl PRL-I ¹²⁵ 300µl buffer RIA	100µl PRL-I ¹²⁵ 200µl buffer RIA 100µl anticuerpo anti-PRL (1:105,000)	50µl suero 100µl PRL-I ¹²⁵ 100µl anticuerpo anti-PRL (1:105,000) 50µl buffer RIA	50mM PO ₄ pH 7.5 150mM NaCl 1 %BSA 50mM EDTA
T3	1,000µl T3-I ¹²⁵ (10,000cp m)	1,000µl T3-I ¹²⁵ 100µl buffer RIA	1,000µl T3-I ¹²⁵ 100µl buffer RIA Tubos con Ab	100µl suero 1000µl T3-I ¹²⁵ Tubos con Ab	Buffer de suero humano

Tabla 3. Descripción de las curvas estándares empleadas en las determinaciones de las diferentes hormonas. B0=Unión en ausencia de hormona fría

5.5.1 Determinación de la concentración de la TRH, TSH, PRL, B y T3.

Para la transformación de los datos, se produce una gráfica lineal de dosis-respuesta para el cálculo de la concentración de hormona en las muestras. En los radioinmunoensayos realizados para las muestras de este experimento usamos la regresión logiT de (B/B0) contra el logaritmo de la dosis:

$$\text{LogiT (B/B0)} = \text{Ln} [(B/B0) / 1-(B/B0)]$$

De esta forma cuando los datos de cpm y dosis de hormona estándar se meten al programa adecuado de transformación Logit –Log se obtiene una correlación lineal, y al meter al mismo programa los datos de cpm de las muestras se obtuvieron los valores de hormona contenidos en las mismas. Finalmente, considerando el volumen de muestra y las diluciones realizadas (factor de dilución) se determinó la concentración final de la hormona.

5.6 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Realizamos un microensayo de Bradford para determinar el contenido de proteínas, para realizar la curva patrón, se utilizó como fuente de proteína BSA (0.5mg/ml) a diferentes concentraciones para tener un rango lineal para así calcular la concentración de proteína en las muestras; la curva se realizó por duplicado (ver tabla 4).

La solución de Bradford se diluyó 1:4 en agua destilada y deionizada, después se filtró para remover partículas que se puedan generar.

	Concentración (µg)	µl BSA (0.5µg/µl)	H ₂ O (µl)	Bradford diluido 1:4 (µl)
Blanco	0	0	10	200
1	0.5	1	9	200
2	1	2	8	200
3	1.5	3	7	200
4	2	4	6	200
5	2.5	5	5	200
6	3	6	4	200
7	3.5	7	3	200
8	4	8	2	200
9	4.5	9	1	200
10	5	10	0	200

Tabla 4. Curva estándar para el ensayo de microBradford

Las alícuotas de proteína con ácido acético obtenidas de las diferentes regiones (ver tabla 1), se neutralizaron con un volumen (1:1) de NaOH 2.5N posteriormente se tomaron diferentes volúmenes de proteína dependiendo de la región (ver tabla 5) para hacer la cuantificación de proteína. Por último se le agregó a cada muestra 200µl de Bradford diluido y se midió la absorbancia a 595nm un espectofotómetro marca Zaphire utilizando el programa Tecan.

Después de obtener los valores de la curva patrón se graficaron los datos para obtener la ecuación de la recta que nos permitió calcular la concentración de proteína de las muestras.

Región	Muestra (µl)						
A.m.	8	Htpm	10	S	15	LNI	10
HMB	15	Htpdv	14	Tal	10	HppP	10
Ap	7	HppA	9	Ac	15		

Tabla 5. Cantidad de muestra de proteína diluida 1:1 en NaOH (2.5 N) de cada región utilizada para el ensayo de Bradford.

5.7 Extracción de RNA

Del núcleo paraventricular y del rafe (incluidos los núcleos del rafe y el área gris periacueductal) disectados se obtuvo el RNA total, utilizando el método de tiocianato de guanidina (*Chomczynski et al 1987*). El primer paso consistió en homogenizar el tejido en un sonicador (Ultrasonic homogenizer 4710) en solución D (4M tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio pH 7.2, 0.5% de sarcocil, 0.1Mβ-mercaptoetanol) en una relación de 0.1mg de tejido por mililitro de solución, después se mezcló con 1/10 del volumen del homogenado de acetato de sodio 2M pH 4, un volumen de fenol saturado en agua libre de RNAsas y 0.2 vols. de cloroformo alcohol isoamilico 49:1, al mezclar con el vortex se obtiene una solución lechosa al agitar; se centrifugaron las muestras a 14000rpm (Microcentrífuga Jouan, rotor con un radio de 74mm) por 16 min a 4°C, se recuperó la fase acuosa en un tubo estéril y se agregó un volumen de fenol saturado en agua libre de RNAsas (ver anexo 2) y un volumen de cloroformo-alcohol isoamilico, se

volvió a agitar y centrifugar a 14000 rpm (Jouan, rotor con un radio de 74mm) por 16 min. a 4°C; después se recuperó la fase acuosa y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto para el NPV y un volumen de isopropanol en el caso del rafé, después se dejó reposar toda la noche a -70°C.

Las muestras del rafé se precipitaron centrifugando a 15000 rpm (Jouan rotor de radio 60 mm) durante 35 min; la pastilla resultante se resuspendió en la mitad del volumen del homogenado inicial de solución D para después agregar dos volúmenes de etanol absoluto y se guardaron a -70° por un lapso de 3 horas.

Posteriormente todas las muestras (NPV y Rafé) se centrifugaron a 15000 rpm (Jouan rotor con un radio de 60mm) durante 35 min; a la pastilla se le agregó 500µl de etanol 75% frío, mezclando suavemente para lavar la pastilla, se centrifugó a 15000rpm (Jouan rotor con un radio de 60mm) por 15 min a 4°C (este lavado se realizó dos veces), y se decantó para dejar secar la pastilla a temperatura ambiente. Después se resuspendió en agua libre de RNAsas, 1/20 del volumen de NaCl 4M y tres volúmenes de etanol absoluto frío dejando en congelación a -70°C por lo menos tres horas. Por último las muestras se centrifugaron a 15000 por 35 min. a 4°C, y se les hizo un lavado con 500µl de etanol 75% frío, se centrifugaron 15000rpm (Jouan rotor con un radio de 60mm) por 15 min a 4°C, se decantaron y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron resuspendidas en agua libre de RNAsas (ver anexo 1) y cuantificada la concentración de RNA inmediatamente.

5.7.1 Cuantificación de la concentración de RNAm total.

Las pastillas son resuspendieron en agua libre de RNAsas (50µl para NPV y 100µl para rafé), tomando de cada muestra 2µl para diluir en 98µl de agua; de esta última solución se colocó en una celda de cuarzo (Sigma) de 100µl. La cuantificación del RNA se hizo midiendo las densidades ópticas (DO) a 260nm y también se registraron las medidas de 230, y 280nm para calcular la pureza del RNA en un espectrofotómetro (DU 650, Beckman). Para calcular la concentración de RNA con los valores obtenidos a 260nm se hizo el siguiente cálculo:

Densidad óptica x factor de dilución x 40 x 1000 = μ g de RNA/ μ l

Donde una OD a 260nm = 40 μ g RNA /ml

El grado de pureza se obtuvo por la relación 260/230nm (para las sales) y 260/280 (para las proteínas), de forma que valores mayores de 1.5 en estas relaciones se consideraron como viables para hacer la transcripción reversa.

5.7.2 Obtención de cDNA a partir del RNA por transcripción reversa (RT)

Después de saber la concentración de RNA, se tomaron alicuotas de cada muestra para tener 1 μ g y se secaron a vacío.

Las alicuotas de 1 μ g de muestra de RNA se resuspendieron en 12 μ l de agua libre de RNAsas, y se calentaron por 15 min a 65^o para posteriormente colocar 5 min a 4^oC; después se agregó una mezcla para llevar a cabo la reacción (8.9 μ l de agua libre de RNAsas, 6 μ l de Buffer 5x, 3 μ l DTT 0.1M, 1 μ l de oligo dT (500ng/ μ l), 0.6 μ l dNTPs 10mM y 0.5 μ l de Transcriptasa Reversa 200U/ μ l) y por último se incubó a 37^oC por 2h.

5.7.3 Amplificación del cDNA por PCR.

En las muestras del NPV se cuantificó el contenido de mRNA-TRH y mRNA-CRH, y en el Rafé, solo se cuantificó el contenido de mRNA-TRH; para ambas regiones se cuantificó como control de cantidad de RNAm el contenido de mRNA de ciclofilina (en el anexo 3 se indican los oligonucleotidos que se utilizaron en la reacción).

De las reacciones de transcriptasa reversa se toma 3 μ l de cDNA para TRH y 6 μ l CRH, y 4 μ l de cDNA para ciclofilina, posteriormente se agregó una mezcla para llevar a cabo la reacción (ver tabla 6), para el cDNA-TRH y cDNA-CRH en el NPV se estandarizaron las reacciones a 24 ciclos y en Rafé a 26 ciclos, mientras que para ciclofilina en NPV se estandarizaron las reacciones a 22 ciclos y 24 ciclos en el Rafé; todas las reacciones de cDNA-TRH y cDNA-ciclofilina se hicieron con ciclos de 94^oC 1:15s, 64^oC 1min, 72^oC 1min; y para las reacciones de CRH los ciclos fueron de 94^oC 1:15s, 63^oC 1min, 72^oC 1min.

Los fragmentos de DNA de TRH y ciclofilina posteriormente se cuantificó la cantidad de DNA por medio de un gel de Agarosa al 2%/TBE1x para DNA de TRH/ciclofilina y 2.5% para DNA de CRH/ciclofilina, cargando 10µl de DNA-TRH o CRH, 4µl de ciclofilina (3µl en el caso del Rafé) y 3µl de colorante en Buffer TBE al 0.5x. La electroforesis duró aproximadamente 40 minutos a 100volts. El gel fue teñido con bromuro de etidio al 1% (diluido en agua desionizada con una concentración 0.06µl/L) durante 10 min. en agitación y se dejó destiñendo en agua destilada otros 10 min. Posteriormente se capturo la imagen del gel por medio de un analizador de imágenes (Fluor S Multimager) que con luz ultravioleta capta la intensidad de las bandas correspondientes al DNA. Por último, los datos se graficaron con una relación de las unidades arbitrarias de mRNA-TRH o mRNA-CRH sobre mRNA de ciclofilina.

TRH (NPV)	TRH (RAFE)	CRH	Ciclofilina
36 µl H ₂ O	33 µl H ₂ O	33 µl H ₂ O	35 µl H ₂ O
5µl Buffer 10x	5µl Buffer 10x	5µl Buffer 10x	5µl Buffer 10x
2.5 µl MgCl ₂ 20x			
1µl Oligo TRHs 25pmol/µl	1µl Oligo TRHs 25pmol/µl	1µl Oligo CRHs 25pmol/µl	1µl Oligo ciclofilina s 50 pmol/µl
1µl Oligo TRHas 25pmol/µl	1µl Oligo TRHas 25pmol/µl	1µl Oligo CRHas 25pmol/µl	1µl Oligo ciclofilina As 50 pmol/µl
1µl dNTPs (10mM)	1µl dNTPs (10mM)	1µl dNTPs (10mM)	1µl dNTPs (10mM)
0.5µl Taq polimerasa 5U/µl	0.5µl Taq polimerasa 5U/µl	0.5µl Taq polimerasa 5U/µl	0.5µl Taq polimerasa 5U/µl
3µl cDNA	6µl cDNA	6µl cDNA	4µl cDNA
Total 50µl	Total 50µl	Total 50µl	Total 50µl

Tabla 6. Especificaciones para la reacción de amplificación del fragmento del RNA de TRH, CRH y Ciclofilina.

5.8 Análisis estadístico.

Se determinó la significancia estadística usando el análisis de varianza (ANOVA programa Statview 4.5) cuando el análisis de varianza presentó una $p < 0.05$ las diferencias significativas entre los grupos se calcularon utilizando el método de comparaciones múltiples de Duncan.

6. RESULTADOS.

6.1 PARÁMETROS FÍSICOS MEDIDOS EN EL MODELO DE EJERCICIO VOLUNTARIO.

6.1.1 Distancia recorrida por sesión. Se determinó la distancia recorrida por día en cada rata que fue sometida a ejercicio voluntario. Como se aprecia en la fig. 6 la mayoría de los animales de los diferentes grupos iniciaron con un recorrido de alrededor de 250m el cual fue incrementando gradualmente hasta llegar a un máximo de 500m por sesión.

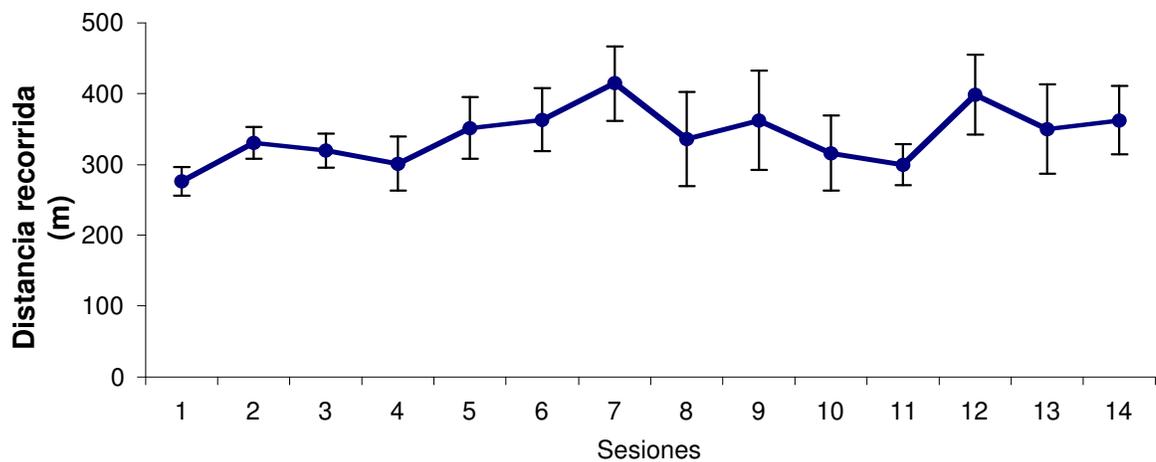


Figura 6. Distancia recorrida por sesión de las ratas macho sometidos a ejercicio voluntario entre 1 y 14 sesiones. Los valores representan el promedio \pm ESM en metros recorridos por cada animal. La distancia se calculó multiplicando el número de vueltas por sesión por el diámetro de la rueda (0.7276m). El número de animales utilizados en las diferentes sesiones fue: 1ª sesión (35), 2 y 3 sesiones (30), 4, 5, 6 y 7 sesiones (20), de 8 a 14 sesiones (10)

6.1.2 Monitoreo del peso corporal de los animales. Todos los animales fueron pesados un día antes ($T_0=100\%$) y durante el experimento (cada tercer día). Observamos que el ejercicio generó una disminución significativa en la ganancia de peso corporal con respecto al grupo intacto y sedentario (figura 7). Desde la sesión 2 se observa que las ratas ejercitadas ganaron 1.8% de su peso con respecto al día T_0 , y 4.5% el sedentario, haciendo una diferencia significativa del 2.7%; para la sesión 3 ganaron 1.1% las ejercitadas, 5.8% las sedentarias y 5.7% las intactas con respecto a su peso en T_0 ,

generando una diferencia significativa del 4.7 y 4.6% respectivamente, esta disminución se mantuvo hasta la sesión 14 con 8.7% con respecto al grupo sedentario y 6.2% con el intacto. Los grupos sedentario e intacto mantuvieron un incremento en el peso corporal de 2.8% y 2.5% diario sin observarse cambios significativos entre estos dos grupos.

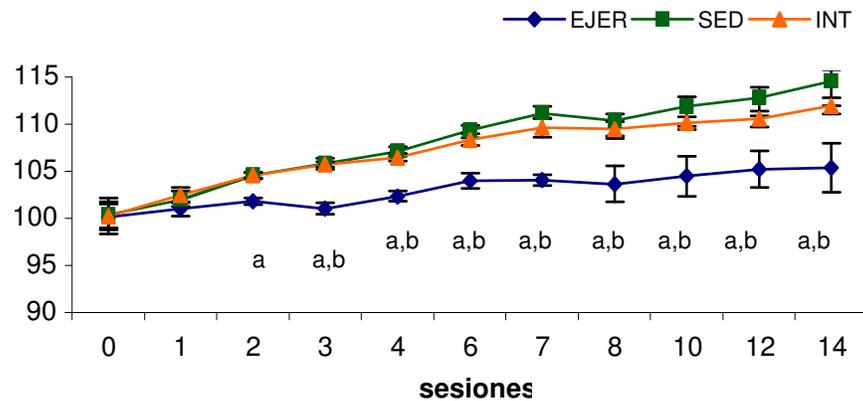


Fig. 7 Influencia del ejercicio sobre la ganancia en el peso corporal. Las gráficas representan los valores del porcentaje de peso ganado cada tercer día con respecto al peso inicial (100%) del grupo ejercitado, sedentario e intacto. Significancia estadística: $p \leq 0.01$ de sedentarias con respecto a ejercitadas (a) y de intactas con respecto a ejercitadas (b) $p < 0.05$. Ejer:ejercitadas, Sed: sedentarias, Int: intactas. El número de animales utilizados por sesión: 1^a: nEjer:30, nSed:32, nInt:32; 2^a: nEjer:25, nSed:27, nInt:28; 3^a: nEjer:10, nSed:10, nInt:11; 4^a: nEjer:15, nSed:17, nInt:17; 6^a y 7^a sesión: nEjer:15, nSed:17, nInt:17; de la sesión 8^a a la 14^a: nEjer:5, nSed:5, nInt:6.

6.1.3 Consumo de alimento en periodo de actividad y reposo. Todos los animales fueron mantenidos con alimento *ad libitum*, el consumo de alimento fue determinado cada tercer día y el día del sacrificio en todos los experimentos. Se determinó además, el consumo en el período de actividad (noche) y de reposo (día). En el periodo de actividad observamos que el ejercicio redujo 34% ($p \leq 0.05$) y 32% ($p \leq 0.05$) el consumo de alimentos con respecto a las ratas intactas y sedentarias a partir de la tercera sesión manteniéndose así hasta la sesión 14 ($p < 0.05$). Las ratas sedentarias mantuvieron una tendencia de mayor ingesta con respecto al grupo intacto haciéndose mayor en la sesión 14 (13%). Si bien las ratas ingieren un porcentaje menor de alimento durante el periodo de luz comparado con el periodo activo (obscuridad) observamos que las ratas ejercitadas

comieron un poco más que los animales intactos y sedentarios en el periodo de reposo; fue evidente que a las 14 sesiones el consumo de alimento aumentó 15% ($p < 0.05$) y 22% ($p < 0.05$) con respecto al grupo intacto y sedentario. Al calcular el consumo total de alimento (actividad + reposo) aún se mantuvo la disminución significativa del 20% ($p < 0.05$) con respecto a sus dos controles desde la 3ª sesión hasta la 14ª. No observamos diferencias significativas en la ingesta de alimento de los grupos sedentarios e intactos (tabla 7), aunque se observa una tendencia a ser mayor en el grupo sedentario.

SESIONES		1	3	7	14
Actividad (g)	EJER	15 ± 1	44 ± 2 ^(a, b)	103 ± 5 ^(a, b)	164 ± 16 ^(a, b)
	SED	15 ± 2	59 ± 3	135 ± 5	252 ± 14
	INT	16 ± 2	58 ± 2	127 ± 4	223 ± 13
Reposo (g)	EJER	7 ± 1	13 ± 1	32 ± 4	97 ± 14 ^(a)
	SED	4 ± 1	13 ± 1	35 ± 1	76 ± 3
	INT	7 ± 1	13 ± 1	36 ± 4	83 ± 5
Total (g)	EJER	22 ± 2	57 ± 3 ^(a, b)	134 ± 7 ^(a, b)	258 ± 21 ^(a, b)
	SED	19 ± 3	73 ± 3	169 ± 6	328 ± 15
	INT	23 ± 3	72 ± 3	166 ± 5	304 ± 1

Tabla 7. Influencia del ejercicio sobre la ingesta de alimento. Los datos muestran el consumo (g) de alimento total, durante el periodo de actividad y de reposo determinado cada dos sesiones. Significancia estadística: $p < 0.05$ ejercitadas con respecto a sedentarias (a) e intactas (b). EJER: ejercitadas, SED: sedentarias, INT: intactas. Animales utilizados por sesión: 1ª : nEjer=5, nSed=5, nInt=5; 3ª: nEjer=10, nSed=10, nInt=11; 7ª: nEj =10, nSed=11, Int=11; 14ª: nEjer=5, nSed=5, Int=6

6.1.4 Determinación del consumo de agua. Como se observa en la tabla 8 hubo un menor consumo de agua de las ratas ejercitadas con respecto a los grupos intacto y sedentario, siendo esta diferencia significativa desde la 3ª sesión de ejercicio (32% $p \leq 0.05$) con respecto al grupo sedentario, mientras que para la sesión 7ª y 14ª es significativa con respecto a los dos grupos. En la sesión 7ª y 14ª las ratas sedentarias

incrementaron su consumo de agua el 16% y 24% respectivamente ($p \leq 0.05$) con respecto a las intactas.

SESIONES ACTIVIDAD	1	3	7	14
Ejercitadas (ml)	18 ± 1	$63 \pm 6^{(a)}$	$144 \pm 9^{(a,b)}$	$229 \pm 8^{(a,b)}$
Sedentarias (ml)	28 ± 2	92 ± 4	$215 \pm 10^{(c)}$	$352 \pm 10^{(c)}$
Intactas (ml)	Nd	77 ± 10	186 ± 11	283 ± 11

Tabla 8. Efecto del ejercicio sobre el consumo de agua en ratas macho en periodo de actividad. La tabla muestra los promedios \pm ESM del agua ingerida (ml) durante el periodo de actividad. Significancia estadística: $p \leq 0.05$ ejercitadas con respecto a las sedentarias (a) e intactas (b) y sedentarias con respecto a intactas (c). Ejer: ejercitadas, Sed: sedentarias, Int: intactas. Animales utilizados por sesión: 1^a: nEjer=5, nSed=5, nInt=5; 3^a: nEjer=10, nSed=10, nInt=11; 7^a: nEj =10, nSed=11, Int=11; 14^a: nEjer=5, nSed=5, Int=6.

6.1.5 Determinación del peso de grasas: parda y blanca interescapular, y epididimal.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales se extrajo las grasas blanca epididimal e interescapular, así como la grasa parda interescapular, las que se pesaron en una balanza granataria. Los valores de los diferentes tipos de grasa fueron corregidos por el peso corporal del animal al momento del sacrificio. En la tabla 9 se muestra que la grasa parda se redujo significativamente con el ejercicio. Al comparar los grupos ejercitados con los animales intactos y sedentarios observamos que en la 3^a sesión disminuyó 20% y 16% ($p \leq 0.05$) respectivamente, en la 7^a sesión un 30% y 26% ($p \leq 0.05$) y en la 14^a el 30% con relación a ambos grupos. También encontramos disminución en la grasa blanca interescapular en la 7^a y 14^a sesión en ratas ejercitadas; el efecto fue significativo en la 14^a sesión con un 31% y 43% ($p \leq 0.05$) respectivamente al grupo intacto y sedentario. La grasa blanca epididimal solo fue determinada a las 3 y 7 sesiones, encontrando que en ambas sesiones también estaba disminuida en ratas ejercitadas aunque en menor grado. La reducción solo fue significativa ($p \leq 0.05$) al comparar con el grupo sedentario con un 20% y con el intacto 25%.

Sesiones	1	3	7	14
Grasa interescapular				
Parda (g/Kg pc)				
Ejercitadas	1.7 ± 0.2	1.6 ± 0.1 ^(a,b)	1.4 ± 0.1 ^(a, b)	1,4 ± 0.1 ^(a,b)
Sedentarias	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2 ± 0.1
Intactas	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2 ± 0.2
Blanca (g/Kg pc)				
Ejercitadas	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.3 ^(a, b)
Sedentarias	1.6 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2
Intactas	1.9 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.9 ± 0.1
Grasa Epididimal (g/Kg. pc)				
Ejercitadas	nd	13 ± 1 ^(a)	12 ± 1.5 ^(a)	5.7 ± 0.4
Sedentarias	nd	16 ± 1	16 ± 1.6	7.2 ± 0.4
Intactas	nd	16 ± 2	15 ± 2.3	5.4 ± 0.2

Tabla 9. Influencia del ejercicio sobre la cantidad de grasa parda y blanca interescapular y la grasa epididimal durante 1, 3, 7 y 14 sesiones. Los valores de la cantidad de grasa fueron corregidos por el peso del animal al momento del sacrificio (g/Kg pc= gramos por kilogramos del peso corporal). Los valores representan el promedio ± ESM de todos los grupos. Significancia estadística: $p < 0.05$ las ejercitadas con respecto a las sedentarias (a) e intactas (b). 1 sesión: Ej. n=5 Sed. n=5 Int. n=5; 3 sesiones: Ej. n=10, Sed. n=10, Int. n=10; 7 sesiones: Ej. n=10, Sed. n=11, Int. n=10 14 sesiones: Ej. n=5, Sed. n=6, Int. n=6.

6.2 EFECTO DEL EJERCICIO VOLUNTARIO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES.

6.2.1 Cuantificación del RNAm-TRH de NPV en ratas con 1, 3, 7 y 14 sesiones de ejercicio voluntario y en los grupos intactos y sedentarios. La determinación del RNAm de TRH se realizó por RT-PCR; en el panel superior de la figura 8 se observan los productos amplificados correspondientes a la expresión del RNAm-TRH y del RNAm-ciclofilina en el núcleo paraventricular. Los histogramas de la parte inferior de la figura 8 corresponden a la relación entre las dos bandas con respecto al grupo intacto el cual se considero 100%. Como se puede observar, el RNAm de TRH disminuyó significativamente desde la 3ª sesión hasta la 14ª en los grupos ejercitados con respecto los intactos. No observamos cambios significativos en el nivel del RNAm de TRH en el NPV de ratas sometidas a ejercicio contra las ratas sedentarias, sin embargo existe una tendencia a disminuir la expresión del mensajero de proTRH en las ratas ejercitadas a la

7ª y 14ª sesión. Solo detectamos cambios significativos en la 3ª sesión entre el grupo intacto y sedentario. (Figura 8).

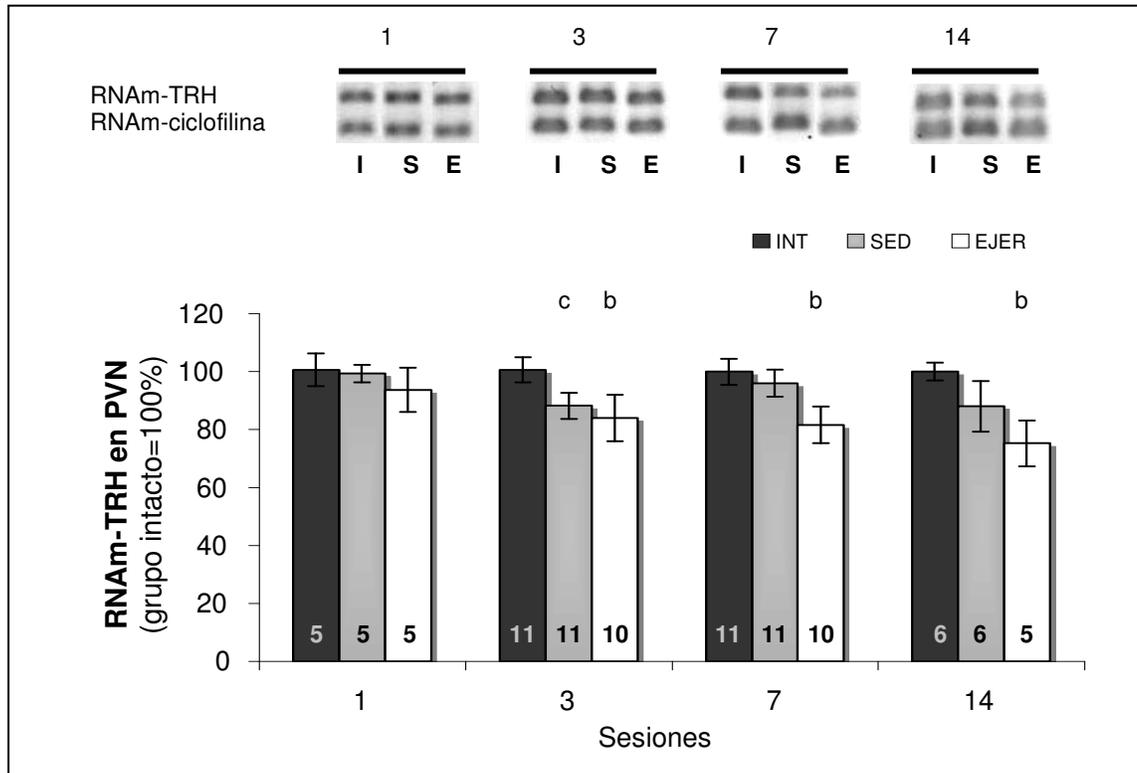


Fig. 8. Cuantificación de RNAm-TRH del NPV por RT-PCR en ratas durante 1, 3, 7 y 14 sesiones de ejercicio. La figura del panel superior es representativa de los gels que muestran las bandas correspondientes a los productos amplificados por RT-PCR del RNAm-TRH y RNAm-ciclofilina. El histograma (panel inferior) presenta los valores de unidades arbitrarias de la cuantificación del RNAm-TRH sobre RNAm-ciclofilina corregido al 100% por el control intacto. Significancia estadística $p < 0.05$ entre las ejercitadas con respecto al grupo intacto (b) y sedentarias con respecto a intactas (c). E:Ejer:Ejercitadas, S:Sed: Sedentarias, I:Intactas.

6.2.2 Cuantificación del nivel de TRH en el hipotálamo medio basal (HMB). El TRH en el HMB fue determinado por radioinmunoensayo y expresado como porcentaje con respecto al grupo intacto. El nivel de TRH inmunoreactivo en el HMB disminuyó significativamente en la primera y séptima sesión de ejercicio un 22% y 32% respectivamente ($p \leq 0.05$), manteniéndose sin cambio en la sesión 14 con respecto al grupo intacto (Fig. 9); no observamos diferencias significativas entre el grupo ejercitado e intacto. Al igual que ocurrió con el nivel del RNAm de TRH en el NPV el nivel de TRH en

el HMB disminuyó 20% en el grupo sedentario con 3 sesiones con respecto al intacto ($p \leq 0.05$).

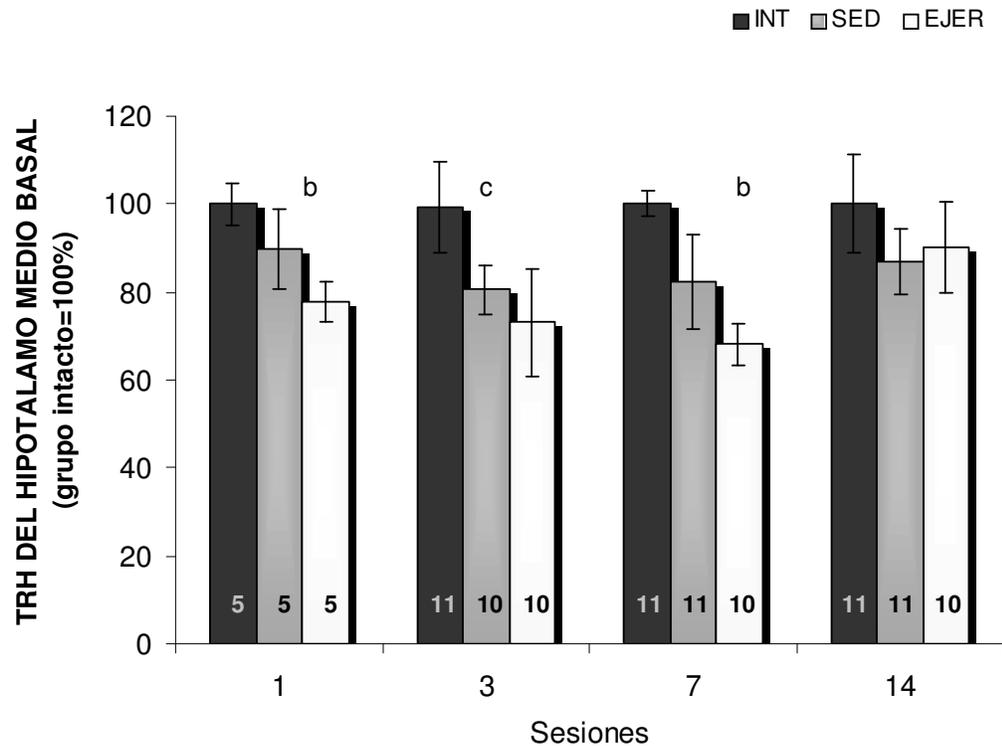


Fig. 9. Niveles de TRH en el hipotálamo medio basal (HMB) en ratas ejercitadas, sedentarias e intactas por 1, 3, 7 y 14 sesiones. Los histogramas representan el promedio \pm ESM del porcentaje del nivel de TRH en HMB con respecto al grupo intacto. Significancia estadística de $p < 0.05$ entre ejercitadas e intactas (b), y entre sedentarias e intactas (c). Ejer: ejercitadas, Sed: sedentarias, Int: intactas

6.2.3 Cuantificación de tirotrópina en suero. El nivel circulante de tirotrópina (Fig. 10) en las ratas ejercitadas se mantuvo sin cambios entre la 1ª y 7ª sesión, similar al grupo intacto pero no en la sesión 14 en la que se mostró una disminución significativa del 60% ($p \leq 0.05$) y 40% ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo intacto y sedentario. En el grupo sedentario a la 1 y 3 sesiones el nivel de tirotrópina se incrementa 40% y 43% ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo intacto, mientras que en la sesión 7ª y 14ª el nivel de tirotrópina se mantuvo sin cambios.

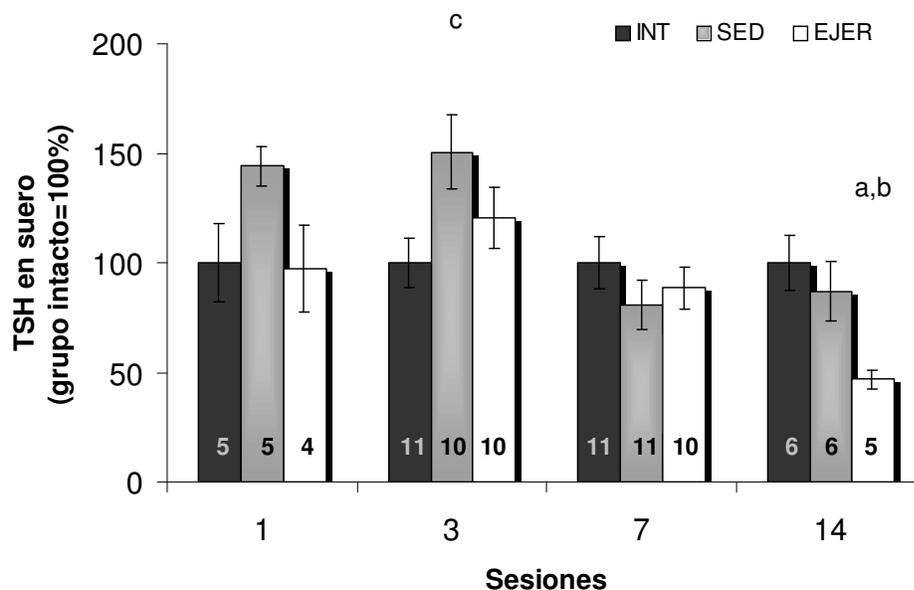


Fig. 10. Concentración de TSH en suero de ratas macho sometidas a 1, 3, 7 y 14 días de ejercicio. Los histogramas representan el promedio \pm ESM del porcentaje de la concentración de TSH con respecto al grupo intacto. Diferencias significativas de $p \leq 0.05$ de ejercitadas con respecto a las sedentarias (a), o intactas (b) y sedentarias con respecto a intactas (c).

6.2.4 Cuantificación de Prolactina circulante. Fue cuantificada la concentración de la prolactina en suero (fig. 11) observando que tanto en el grupo sedentario como ejercitado a la 1ª y 3ª sesión se incrementa con respecto al grupo intacto, sin que dichos cambios sean significativos. Similar a lo que ocurre con la tirotrópina, el nivel de prolactina disminuye en la 14ª sesión 60%, respectivamente con respecto al grupo intacto ($p \leq 0.05$). También el grupo sedentario presenta una disminución significativa en la sesión 14 con respecto al grupo intacto. No se observaron variaciones significativas entre los grupos sedentarios y ejercitados.

6.2.5 Cuantificación de triyodotironina total en suero (T3). En la Fig. 12 se muestra que la T₃ circulante disminuyó en la 1ª sesión con respecto al grupo sedentario 20% ($p \leq 0.05$), para regresar a valores similares al grupo control desde la sesión 3 hasta la 14. La T₃ no mostró variaciones significativas entre los grupos sedentarios e intactos.

6.2.6 Cuantificación de tiroxina total en suero (T4). En la Fig. 13 se muestra que la T₄ circulante no presenta cambios significativos entre las ejercitadas y sus grupos control. La T₄ además no mostró variaciones significativas entre los grupos sedentarios e intactos.

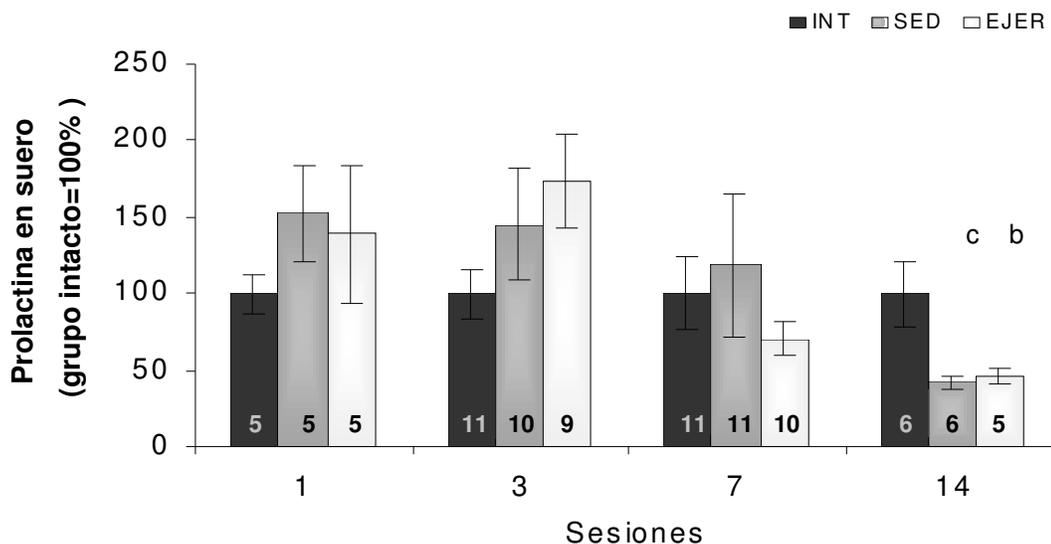


Fig. 11. Concentración de prolactina en suero de ratas macho sometidas a 1, 3, 7 y 14 días de ejercicio. Los histogramas representan el promedio \pm ESM de la concentración de prolactina en suero corregido al 100% con el control intacto. Diferencia significativa de $p < 0.05$ de ejercitadas (b) y sedentarias (c) con respecto a las intactas. EJER: Ejercitadas, SED: Sedentarias, INT: Intactas.

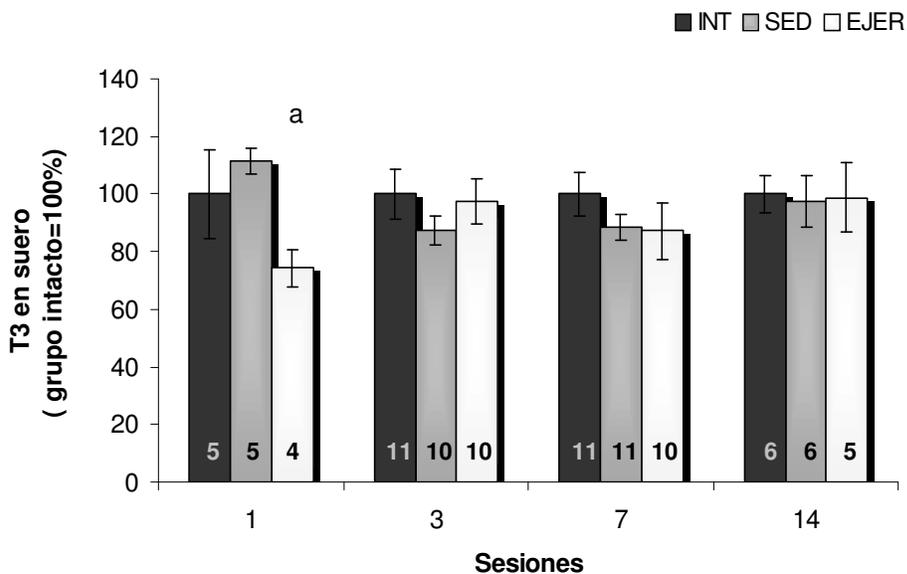


Fig. 12. Concentración de T3 en suero de ratas macho sometidas a 1, 3, 7 y 14 sesiones de ejercicio y aislamiento. Los histogramas representan el promedio \pm ESM de la concentración de T3 en suero corregido al 100% con el control intacto. Diferencia significativa de $p < 0.05$ de ejercitadas con respecto a sedentarias (a) e intactas (b). Ejer: ejercitadas, Sed: sedentarias. Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento.

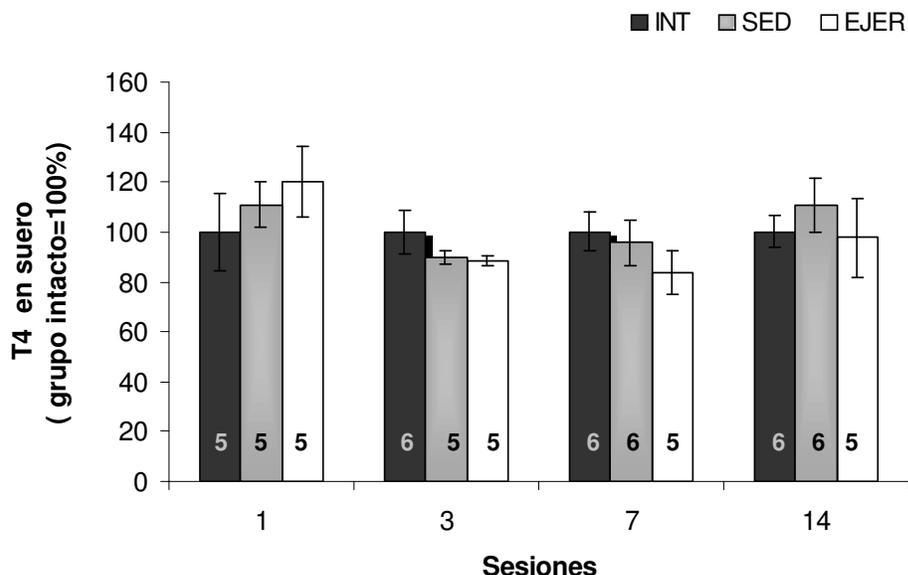


Fig.13. Concentración de T4 en suero de ratas macho sometidas a 1, 3, 7 y 14 días de ejercicio y aislamiento. Los histogramas representan el promedio \pm ESM de la concentración de T4 en suero corregido al 100% con el control intacto. EJER: ejercitadas, SED: sedentarias, INT: Intactas. Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento.

6.3 EFECTOS DEL EJERCICIO VOLUNTARIO EN DIFERENTES PARÁMETROS DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL.

En el protocolo de ejercicio utilizado en esta tesis, los animales se colocaron en forma individual en una jaula provista de la rueda giratoria, esto conlleva que las ratas se encuentren aisladas durante todo el periodo de actividad, por lo que es probable que exista un cierto grado de estrés en nuestros animales. Para determinar si esto ocurre cuantificamos diferentes parámetros de la actividad del eje adrenal.

6.3.1 Cuantificación de RNAm-CRH de NPV en ratas con 1, 3, 7 y 14 sesiones de ejercicio voluntario. El RNAm de CRH en el NPV fue cuantificado por RT-PCR. En la parte superior de la figura 14 se observan las bandas correspondientes a la amplificación de los productos del RNAm-CRH y del RNAm-ciclofilina la comparación entre los diferentes grupos se realizó utilizando la relación entre estas dos bandas. Observamos una disminución significativa en la expresión del RNAm-CRH en la sesión 1 y 14 en las

ratas ejercitadas con respecto al grupo intacto, mientras en la sesión 3 y 7 se observa un incremento de 8% y 20% ($p \leq 0.05$), respectivamente. No se observaron diferencias entre los grupos sedentarios e intactos (figura 14, parte inferior).

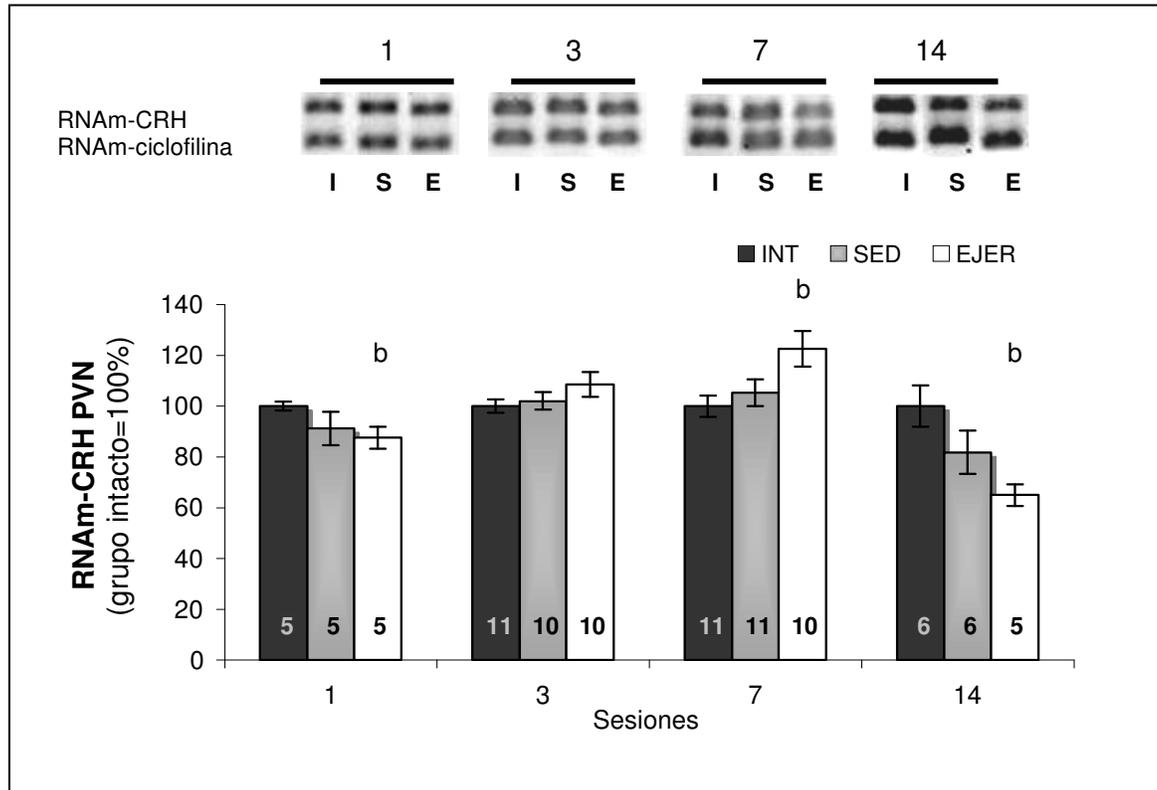


Fig. 14. Cuantificación de RNAm-CRH del NPV por RT-PCR en ratas durante 1, 3, 7 y 14 sesiones. El panel superior es representativo de los fragmentos de DNA amplificados por PCR, la banda superior corresponde al RNAm-CRH y la inferior RNAm-ciclofilina. El histograma presenta el promedio de los cocientes en unidades arbitrarias de la cuantificación del RNAm-CRH sobre RNAm-ciclofilina corregido al 100% por el control intacto. Significancia estadística $p < 0.05$ entre las ejercitadas con respecto al grupo intacto (b). EJER:Ejercitadas SED:Sedentarias INT:Intactas

6.3.2 Cuantificación de Corticosterona en suero. Cuantificamos la concentración de corticosterona en suero (Fig. 15) y se observó un aumento de 120% en la primera sesión del grupo sedentario ($p \leq 0.01$) y un 80% de ejercitados ($p \leq 0.01$) con respecto al grupo intacto. En la sesión 3, se observó un aumento del 500% ($p \leq 0.01$) en el nivel corticosterona en las ratas ejercitadas con respecto a los otros dos grupos. En las sesiones 7 y 14 no existieron cambios significativos entre los diferentes grupos.

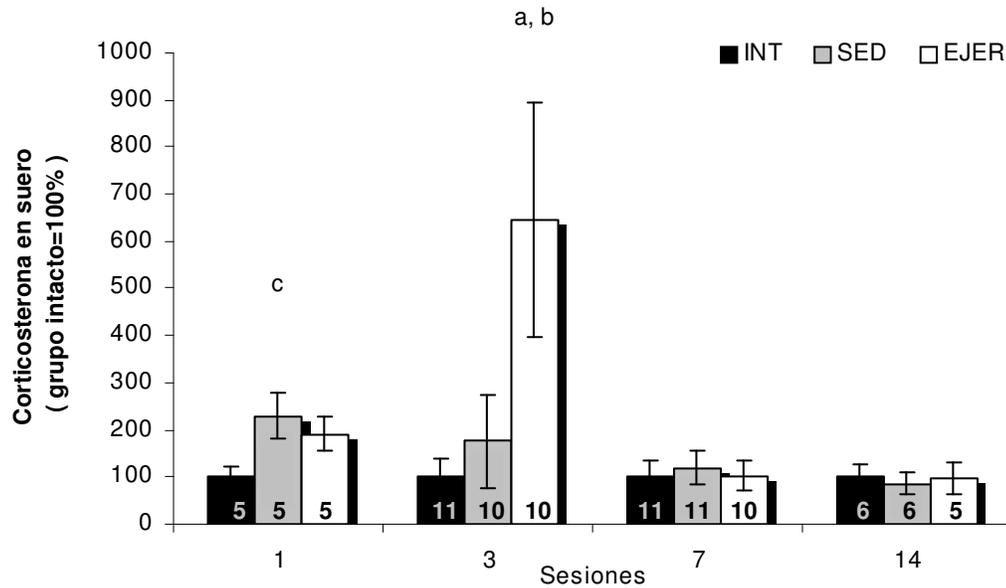


Fig. 15. Concentración de corticosterona en suero de ratas macho sometidas a 1, 3, 7 y 14 días de ejercicio. Los histogramas representan el promedio \pm ESM de la concentración de corticosterona en suero corregidos al 100% del grupo de ratas intactas. Diferencias significativas: $p < 0.05$ ejercitadas con respecto a las sedentarias (a), o intactas (b), sedentarias con respecto a intactas (c). EJER: ejercitadas, SED: sedentarias, INT: intactas. Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento.

6.3.3 Determinación del peso de la glándula adrenal en ratas ejercitadas, sedentarias e intactas. En la tabla 4 se muestran los pesos (mg) de las glándulas adrenales de los diferentes grupos experimentales, como se puede observar no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Tampoco se encontraron diferencias en el tamaño de la glándula adrenal izquierda y la derecha (datos no mostrados).

	1	3	7	14
Glándulas Adrenales (mg)				
Ejercitadas	73 ± 4	68 ± 2	60 ± 2	69 ± 4
Sedentarias	78 ± 4	56 ± 6	63 ± 3	60 ± 2
Intactas	69 ± 3	66 ± 2	59 ± 3	52 ± 4

Tabla 4. Influencia del ejercicio sobre el peso de la glándula adrenal durante 1, 3, 7 y 14 sesiones. Los valores representan el promedio ± ESM del peso (mg) de las glándulas adrenales. Ejer: ejercitadas, Sed: sedentarias, Int: intactas. Animales utilizados por sesión: 1^a:nEjer=5, nSed=5, nInt=5; 3^a: nEjer=10, nSed=10, nInt=11; 7^a: nEj =10, nSed=11, Int=11; 14^a: nEjer=5, nSed=5, Int=6

6.4 CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO DE TRH EN DIFERENTES REGIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

En todas las regiones en las que se cuantificó el TRH fueron divididas en izquierda y derecha por separado para determinar de una manera mas fina y puntual los efectos en la biosíntesis TRHérgica durante el ejercicio voluntario.

6.4.1 Regiones hipotalámicas.

6.4.1.1 Area preóptica. El TRH en el área preóptica no mostró cambios significativos entre los diferentes grupos (figura 16).

6.4.1.2 Hipotálamo posterior (comprende a los núcleos dorsomedial, ventromedial y parte del lateral). La TRH cuantificada en esta región hipotalámica (figura 17) presentó una disminución significativa del 52% ($p \leq 0.05$) en el lado derecho de la 7^a sesión en las ratas ejercitadas respecto al grupo sedentario, mientras que el grupo de 14 sesiones de ratas sedentarias presentó un aumento en el lado izquierdo con respecto al grupo intacto (120%).

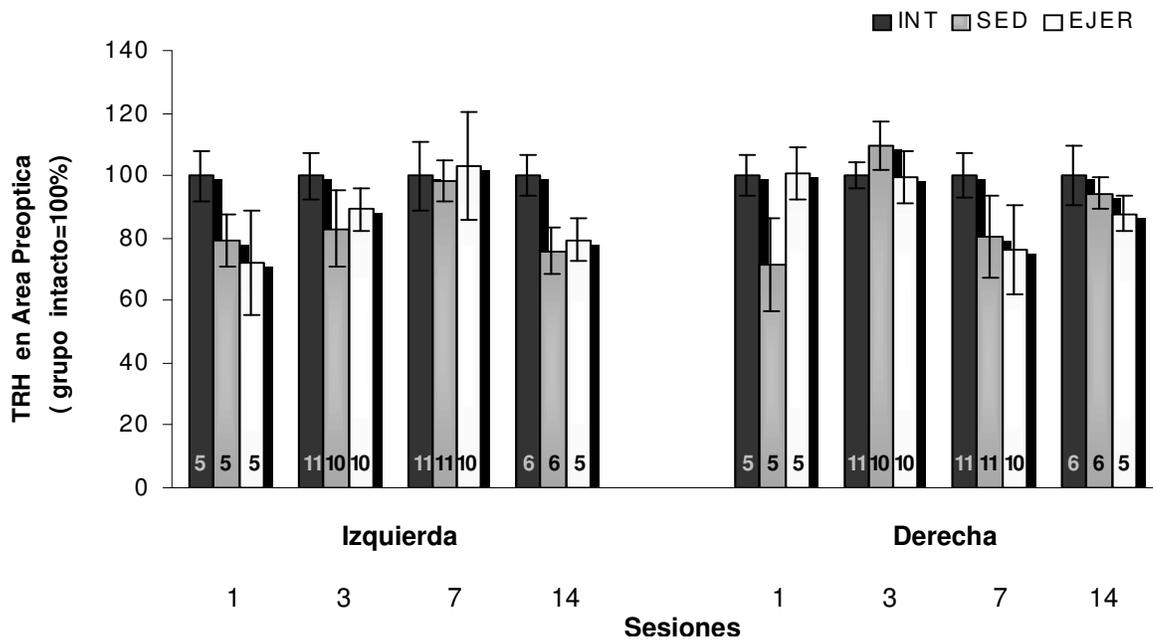


Fig. 16. Niveles de TRH en el área preóptica en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 sesiones. Los histogramas representan el porcentaje de la concentración de TRH corregidos al 100% con respecto al grupo intacto del lado izquierdo o lado derecho. EJER:Ejercitadas, SED: Sedentarias, INT:Intactas. Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento.

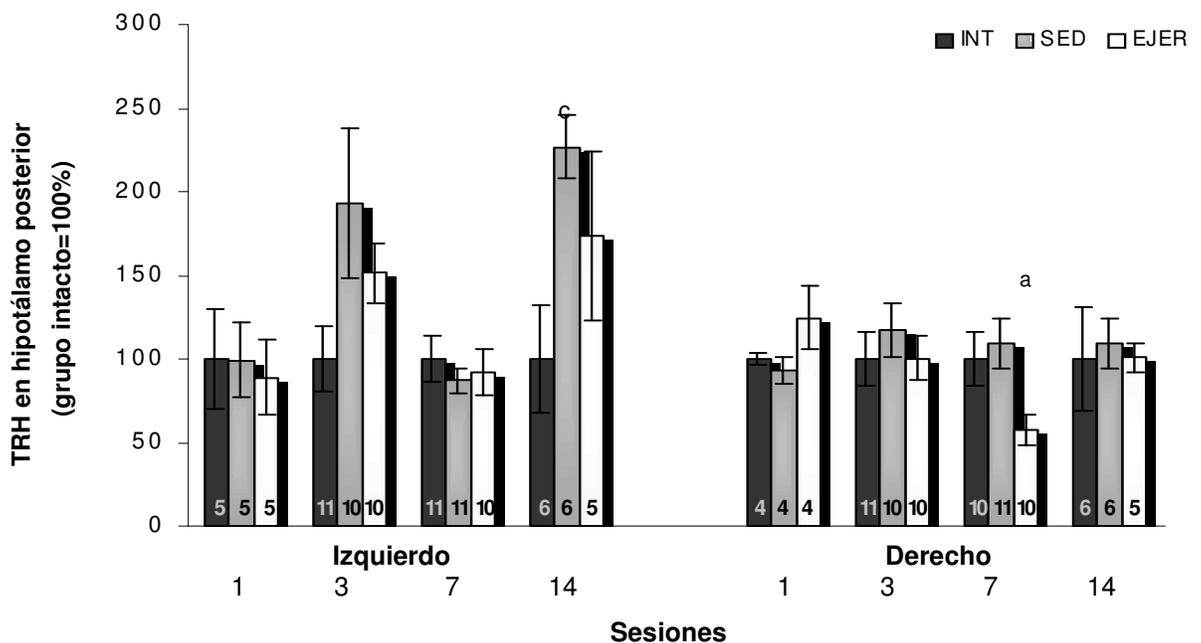


Fig. 17. Niveles de TRH en el hipotálamo posterior en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 días. Los histogramas representan el porcentaje de la concentración de TRH corregidas al 100% con respecto al grupo intacto de cada lado. Significancia estadística: $p < 0.05$ entre ejercitadas e intactas (b), entre sedentarias e intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER:Ejercitadas, SED:Sedentarias, INT:Intactas

6.4.1.3 Cuerpos mamilares. La TRH cuantificada en los cuerpos mamilares del lado izquierdo (Fig 18) mostró disminución en el grupo ejercitado a la 1^a (32%, $p \leq 0.05$), 7^a (26% $p \leq 0.05$) y 14^a (22% $p \leq 0.05$) sesión comparada con el grupo intacto, esta disminución también se presenta en sedentarios con respecto a los intactos en la sesión 1 (25% $p \leq 0.05$) y 14 (40% $p \leq 0.05$). En el lado derecho solo se observó una disminución de TRH del 31% a la primera sesión al comparar las ratas sedentarias con respecto a intactas.

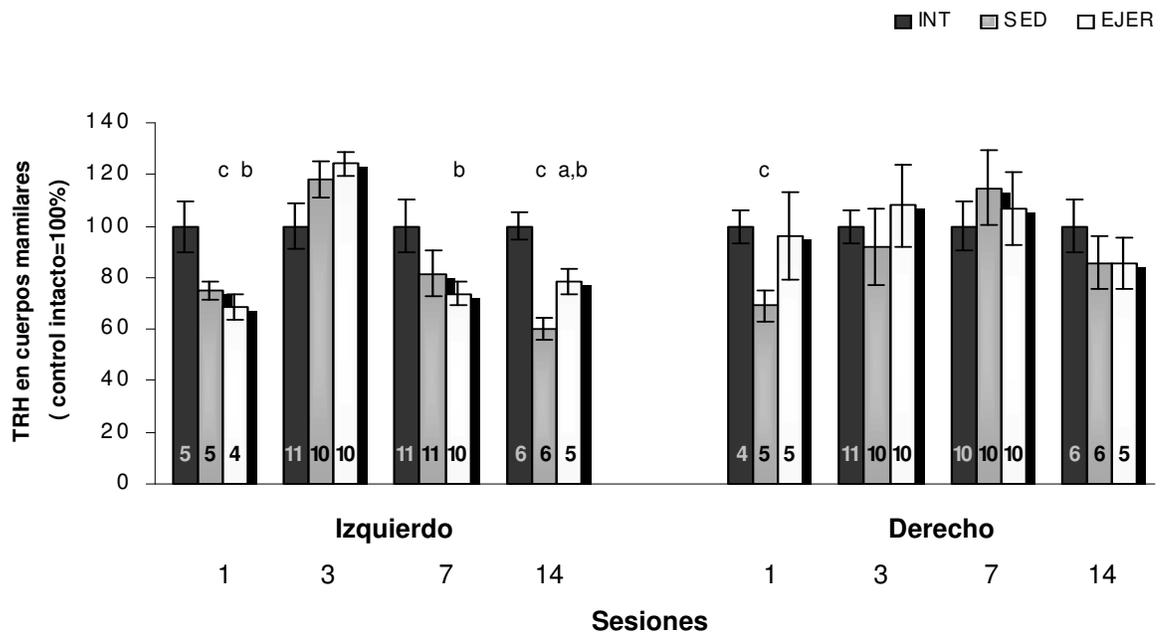


Fig. 18. Niveles de TRH en los cuerpos mamilares en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 días y sus controles. La gráfica presenta los valores de la TRH corregidos en porcentaje con respecto al grupo intacto, del lado izquierdo cerebral y lado derecho cerebral. Significancia estadística entre ejercitadas y sedentarias (a), e intactas (b), y entre sedentarias e intactas (c). EJER: Ejercitadas, SED: Sedentarias, INT: Intactas. Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento.

6.4.2 Regiones del sistema límbico

6.4.2.1 Amígdala. No observamos cambios significativos en el contenido de la TRH en amígdala del grupo ejercitado con respecto a sus dos controles (Fig. 19), en las ratas sedentarias se observó una disminución del 30% a la 3^a sesión del contenido de TRH en el lado derecho con respecto al grupo intacto.

6.4.2.2 Hipocampo anterior. La TRH cuantificada en el hipocampo anterior del lado derecho presentó cambio en las 7^a sesión donde se observó un aumento del contenido de TRH del grupo de ratas ejercitadas (69%, $p \leq 0.05$) y sedentarias (135%, $p \leq 0.05$) con respecto al grupo intacto (figura 20).

6.4.2.3 Hipocampo posterior. El contenido de TRH en el hipocampo posterior presentó cambios únicamente en el lado derecho de los animales ejercitados y sedentarios en la 3^a sesión donde se observa una disminución del contenido de TRH del grupo de ratas ejercitadas (46%, $p \leq 0.05$) y sedentarias (56%, $p \leq 0.05$) con respecto al grupo intacto (figura 21).

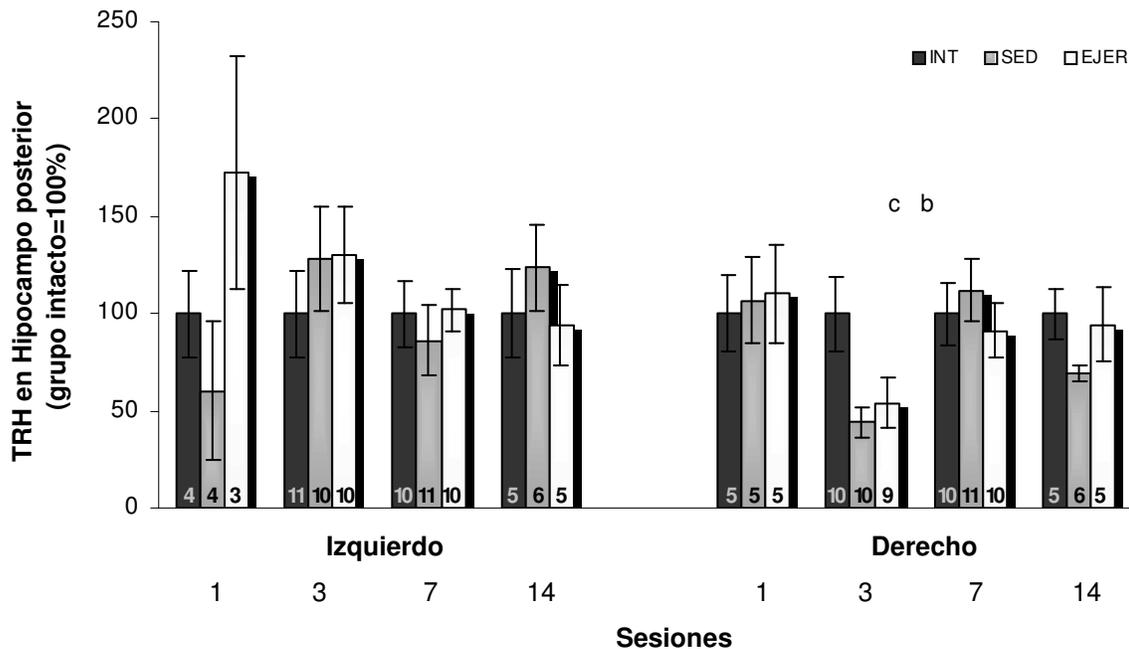


Fig. 21. Niveles de TRH en el hipocampo posterior en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 días y sus controles. Los histogramas representan el porcentaje de la concentración de TRH con respecto al grupo intacto (100%) en el lado izquierdo y lado derecho cerebral. Significancia estadística de $p < 0.05$ entre sedentarias e intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER: Ejercitados, SED: Sedentarios. INT: Intactos

6.4.2.4 Septum. En el lado izquierdo de la 1^a sesión determinamos un incremento no significativo del contenido de TRH tanto en el grupo sedentario como ejercitado con

respecto al grupo intacto. También el contenido de TRH aumenta 59% ($p \leq 0.05$) en la región derecha en la 3ª sesión en el grupo ejercitado con respecto al grupo intacto y un 102% ($p \leq 0.05$) contra el sedentario. Mientras que el grupo sedentario mostró una disminución (43% $p \leq 0.05$) en el contenido de TRH en este mismo lado con respecto al grupo intacto (fig. 22).

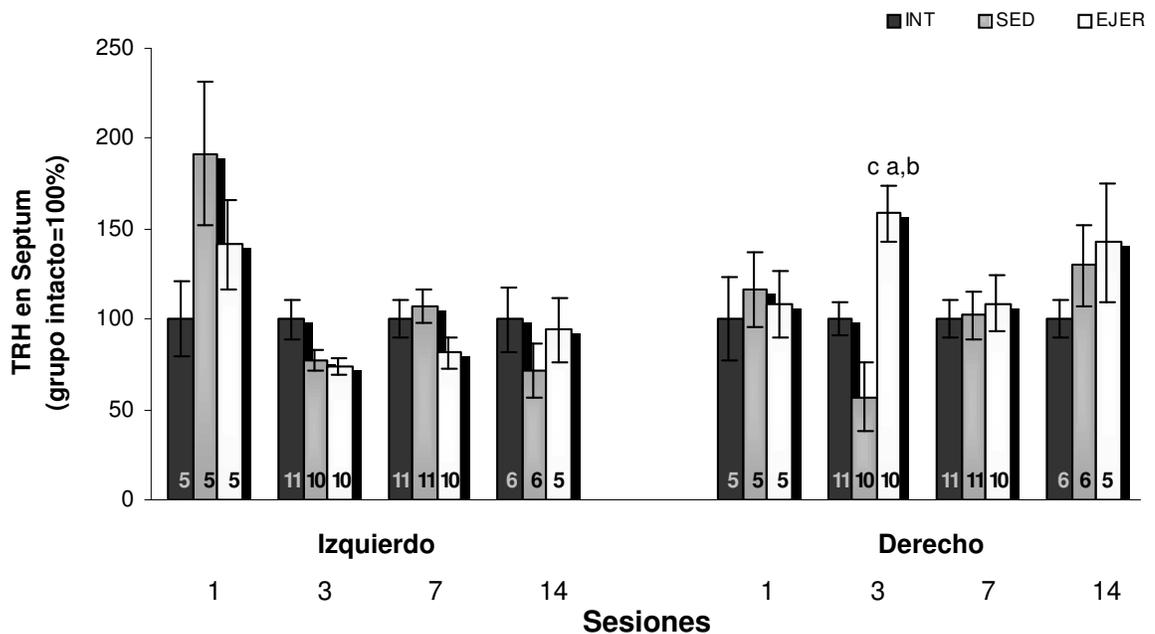


Fig. 22. Niveles de TRH en el septum en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 días. Los histogramas representan el promedio \pm ESM del porcentaje de la concentración de TRH con respecto al grupo intacto (100%) de cada lado en el lado izquierdo y lado derecho cerebral. Significancia estadística de $p < 0.05$ entre ejercitadas y sedentarias (a) o intactas (b) y entre sedentarias e intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER:Ejercitadas, SED:Sedentarias, INT:Intactas

6.4.2.5 Tálamo. El contenido de TRH en el tálamo, presentó cambios en la sesión 7ª donde se observó una disminución significativa de un 43% ($p \leq 0.05$) en el lado izquierdo del grupo de ratas ejercitadas y del 36% ($p \leq 0.05$) en las sedentarias con respecto al grupo intacto. No se observaron cambios en el contenido de TRH del lado derecho de los diferentes grupos (ver figura 23).

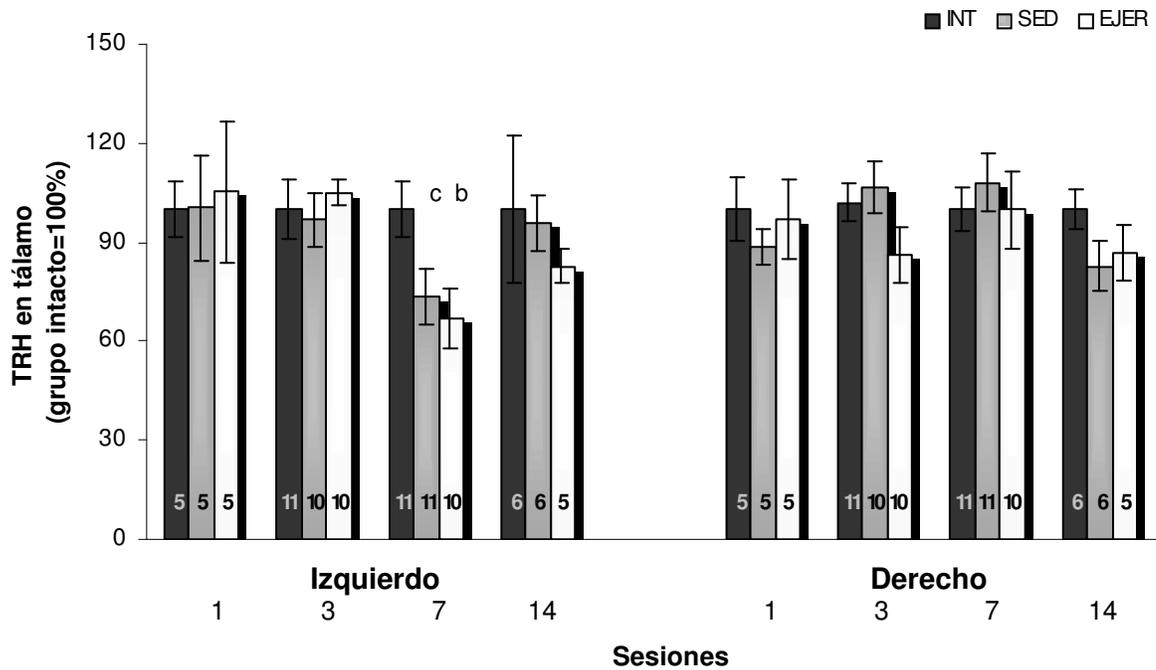


Fig. 23. Niveles de TRH en el tálamo en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 sesiones. Los histogramas representan el promedio \pm ESM del porcentaje de la concentración de TRH con respecto al grupo intacto (100%) de cada lado. Significancia estadística de $p \leq 0.05$ entre ejercitadas e intactas (b) y entre sedentarias e intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER:Ejercitadas, SED:Sedentarias, INT:Intactas

6.4.3 Acumbens. Como se puede apreciar en la fig. 24 el contenido de TRH del lado izquierdo se incrementó en el grupo ejercitado a las 7 sesiones con respecto al grupo intacto y al sedentario (38% $p \leq 0.05$). A diferencia de este incremento en la 7ª sesión, en la sesión 14ª tanto el contenido de TRH de las ratas ejercitadas como sedentarias disminuyó al comparar con el grupo intacto (24% y 32% respectivamente $p \leq 0.05$). En el lado derecho, se observó disminución significativa (30% $p \leq 0.05$) del nivel de TRH en la 1ª sesión con respecto al grupo sedentario. Mientras que en la 14ª sesión tanto en el grupo ejercitado (53%) como el sedentario (40% $p \leq 0.05$) bajó el contenido de TRH con respecto al intacto (figura 24).

6.4.4 Neurohipófisis

Lóbulo neurointermedio. La TRH del lóbulo neurointermedio en las ratas ejercitadas a la 3ª y 7ª sesión disminuyó con respecto a los grupos intactos un 24% ($p \leq 0.05$) y sedentarios un 28% ($p \leq 0.05$), el efecto fue significativo solo para la 7ª sesión (fig. 25).

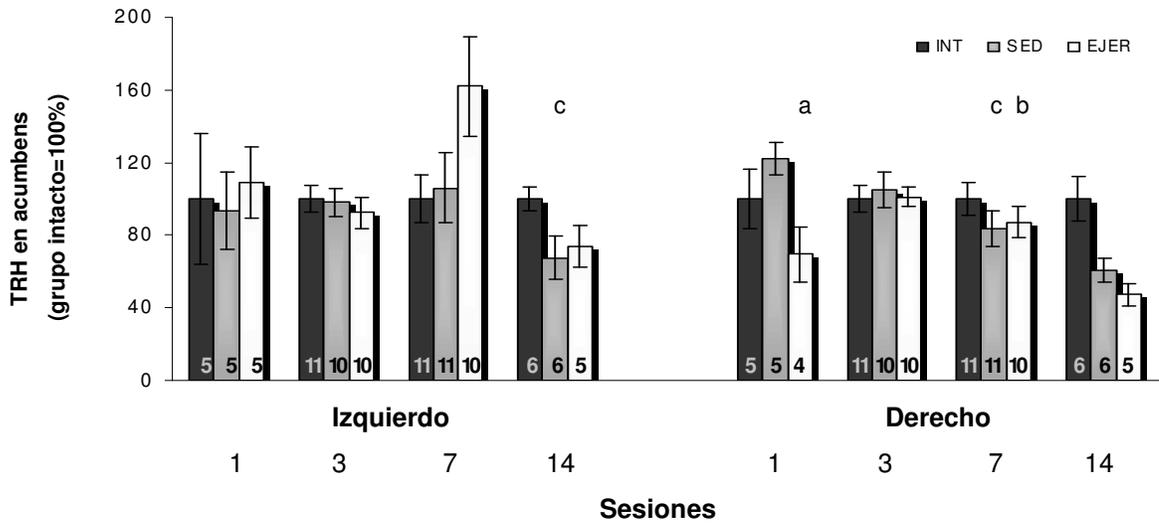


Fig. 24. Niveles de TRH en el acumbens en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 días y sus controles. Los histogramas representan el porcentaje de la concentración de TRH con respecto al grupo intacto (100%) en el lado izquierdo y lado derecho cerebral. Significancia estadística $p < 0.05$ entre ejercitadas y sedentarias (a) o intactas (b) y entre sedentarias e intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER: Ejercitadas, SED: Sedentarias, INT: Intactas

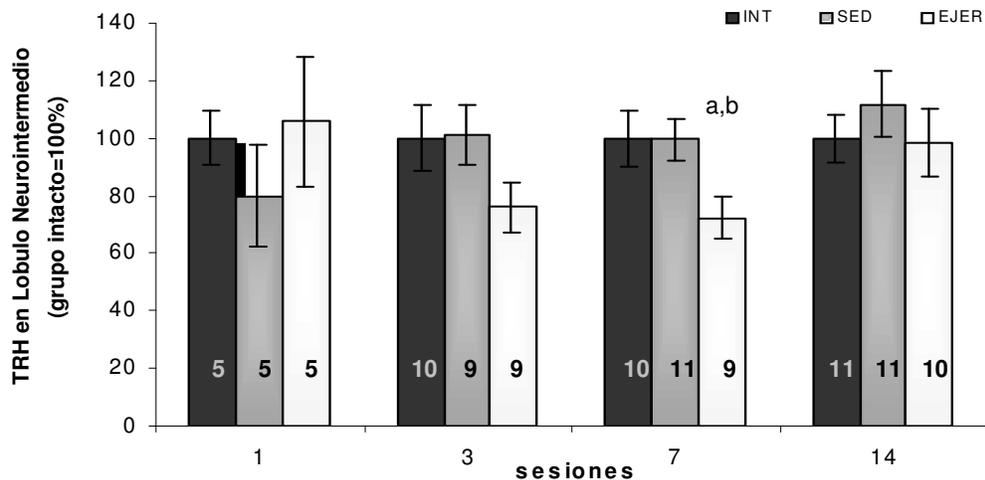


Fig. 25. Niveles de TRH en el lóbulo neurointermedio en ratas ejercitadas por 1, 3, 7 y 14 días y sus controles. Los histogramas representan el promedio \pm ESM del porcentaje de la concentración de TRH con respecto al grupo intacto (100%). Significancia estadística de $p < 0.05$ entre ejercitadas y sedentarias (a) o intactas (b) y entre sedentarias e intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER: Ejercitadas, SED: Sedentarias, INT: Intactas

6.5 NÚCLEOS DEL RAFÉ DORSAL Y AREA GRIS PERIACUEDUCTAL.

6.5.1 RNAm-TRH en Núcleos del Rafe-área gris periacueductal. Se ha demostrado que el Rafé y la sustancia gris periacueductal son regiones que pueden estar involucradas en el control de la respiración durante el ejercicio (Ao, et al 2006). Además, recientemente se ha demostrado que la aplicación de TRH intracisternal, incrementa la ingesta de alimento en la rata. Con base en estos antecedentes, decidimos determinar si el RNAm de TRH en estas dos regiones se modifica durante el ejercicio voluntario. Al igual que en otras regiones el RNAm de TRH fue cuantificado por RT-PCR y la amplificación fue corregida por la cantidad de RNAm de ciclofilina. En el panel superior de la figura 26 se observan muestras representativas de los tres grupos experimentales empleados en este trabajo en las diferentes sesiones. En la sesión 1 se detectó una disminución en el nivel de RNAm de TRH del grupo sedentario con respecto al ejercitado (45% $p \leq 0.05$) e intacto (37%). Posteriormente este nivel del RNAm-TRH se recupera por arriba del grupo intacto en la 3ª sesión logrando ser significativo en la 7ª sesión. El nivel de TRH de las ratas ejercitadas sólo se modificó en la tercera sesión, incrementándose un 30% ($p \leq 0.05$) con respecto al grupo intacto. En la 7ª y 14ª el ejercicio mantuvo un nivel del RNAm de TRH por arriba del grupo intacto sin que estos logren ser significativos.

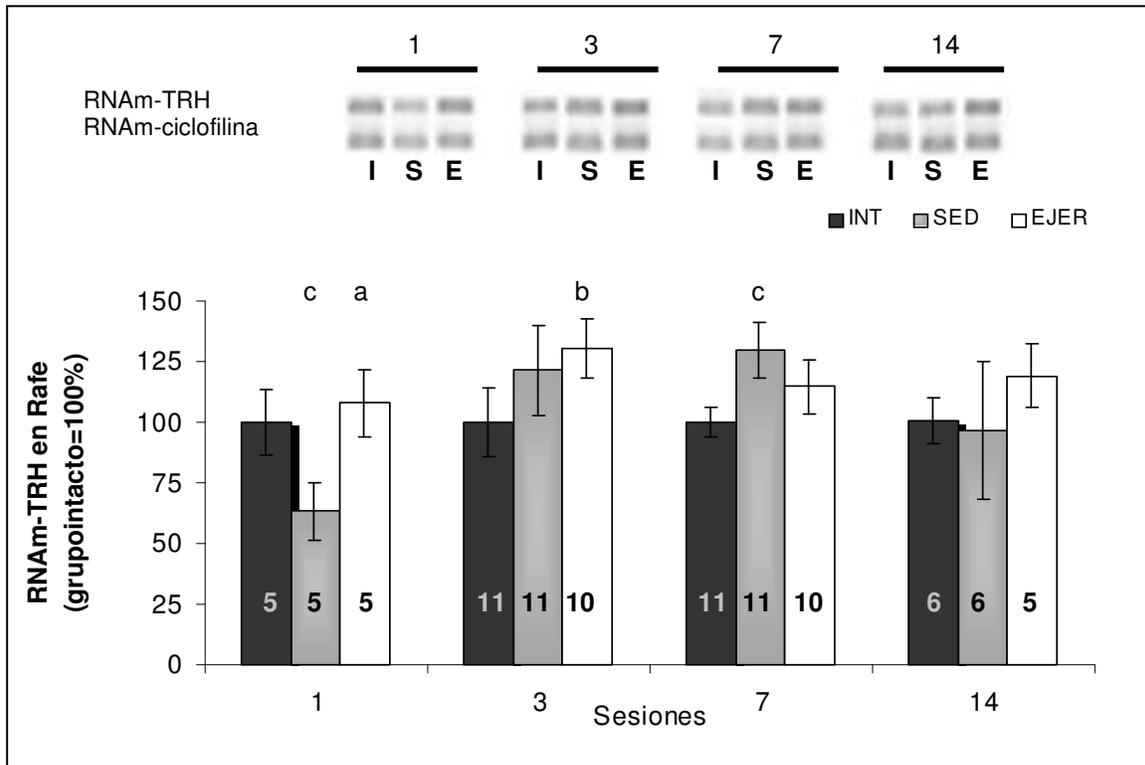


Fig. 26. Cuantificación de RNAm-TRH del Rafé y área gris periacueductal por RT-PCR en ratas durante 1, 3, 7 y 14 sesiones. El panel superior de la figura es una muestra representativa de las bandas de DNA correspondientes a la amplificación por PCR del cRNA-TRH y cRNA-ciclofilina en el Rafé y área gris periacueductal. El histograma (panel inferior) presenta la relación de los valores en unidades arbitrarias de la cuantificación del RNAm-TRH sobre RNAm-ciclofilina corregido al 100% por el control intacto. Significancia estadística $p < 0.05$ entre las ejercitadas con respecto al grupo sedentario (a) o intacto (b) y sedentarias con respecto a intactas (c). Los números dentro de las barras corresponden al número de animales utilizados durante el experimento. EJER: Ejercitadas, SED: Sedentarias, INT: Intactas

7. DISCUSIÓN

El alarmante incremento en el índice de obesidad en el mundo ha contribuido al desarrollo de estrategias que permitan controlar eficientemente el peso y cantidad de grasa corporal. Lo que ha llevado a tratar de definir los mecanismos celulares y moleculares que controlan el apetito, así como la regulación del gasto energético. En este trabajo, tuvimos como objetivo, determinar si el ejercicio voluntario modula la actividad metabólica de la hormona liberadora de tirotropina en el eje HHT y en diferentes regiones del SNC.

7.1 Modelo experimental.

Diversos trabajos de investigación han mostrado que durante el ejercicio se incrementa el gasto energético y se disminuye la ingesta, lo que produce una disminución en el peso corporal (*Lewis et al 1993, Bi et al 2005, Kawaguchi et al 2005, Fediuc et al 2006*). Decidimos utilizar el modelo de ejercicio voluntario para generar un incremento en el gasto energético de la rata sin que los animales sufrieran cambios importantes en la temperatura corporal como en el nado y el ejercicio forzado (*Woody et al 1998, Larue-Achagiotis et al 1995*), ya que previamente hemos demostrado que la exposición a 4°C activa al sistema TRHérgico del eje HHT (*Uribe et al 1993*); sabemos también que la TRH del eje tiroideo, como de la amígdala se altera en condiciones de estrés. Puesto que en nuestro modelo es necesario colocar a los animales en cajas individuales y lo que les provoca estrés por aislamiento, decidimos emplear un grupo de animales intactos que nos permitiera determinar si las ratas sedentarias (aisladas) tienen modificaciones en la actividad TRHérgica por el aislamiento en el periodo de actividad.

Se ha observado que las ratas corren voluntariamente grandes distancias y esto depende de la cepa y el género. Nosotros utilizamos ratas machos *wistar*, y encontramos que corren una distancia máxima de 500 m/sesión, al compararse con otros protocolos es una distancia corta. Sin embargo, este estímulo fue suficiente para generar una disminución en la ingesta de alimento en el periodo de actividad y la talla corporal desde la tercera sesión como se ha reportado por otros autores (*Levitsky 1970; Lewis et al 1993; Looy y*

Eikelboom 1989, Kawaguchi et al 2005 lo que nos indicó que el modelo es adecuado para cumplir nuestro objetivo.

Existen evidencias que el ejercicio a largo plazo induce un aumento en el consumo de agua para compensar la deshidratación y poder mantener la temperatura corporal (*Backhouse et al 2007*); a diferencia de lo reportado observamos una disminución en el consumo de agua desde la tercer sesión de ejercicio, lo que correlaciona con la disminución en el consumo de comida en el grupo de ratas ejercitadas, mientras que en las ratas sedentarias se observó un ligero incremento en la ingesta de comida con un aumento en el consumo de agua (comparadas con el grupo intacto), por lo que el consumo de agua podría estar en función de la toma de comida. Es posible también que la disminución en el consumo de agua en el ejercicio voluntario se debe a la liberación de moléculas de agua producto de la movilización y la oxidación de grasas por la demanda energética (*Comizio et al 1998*), por ejemplo el palmitato que por cada molécula oxidada se liberan 145 moléculas de agua (ver figura 2), y dado que en nuestro protocolo no es una condición de ejercicio extenuante la rata no se deshidrata.

Observamos también, al igual que otros reportes (*Bi et al 2005, Bulow et al 2004; Romijn et al 1993*) que el ejercicio disminuyó la grasa parda y blanca interescapular, así como la grasa blanca epididimal después de siete sesiones. Esto es importante, ya que con esto demostramos que la demanda energética está incrementada, es decir que los animales se encuentran con un balance energético negativo. El efecto fue más sensible en la grasa parda, lo que está de acuerdo con el hecho de que el tejido pardo café se oxida fácilmente para producir calor, además que su movilización es mayor que la grasa blanca debido a que en este tejido se induce 3 veces más la lipólisis que en la grasa intramuscular o de ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo para la utilización de energía que el sistema requiere durante el ejercicio dado que las grasas son el tejido que aporta mayor cantidad de energía, (*Droste et al 2003, Bulow 2004, Romijn et al 1993, Bi et al 2005, Wolfe et al 1990, Jeukendrup 2003*), como en el caso del palmitato que aporta 129 moléculas de ATP. El tejido adiposo también libera citocinas por ejemplo adiponectina, interleucina 6 [IL-6] y resistina las cuales pueden influenciar a la insulina además de estimular a la CRH y en consecuencia al cortisol el cual incrementa la lipólisis (*Yamauchi et al 2001, Rothwell 1994, Steensberg et al 2003, Berg et al 1994, McMurray 2005*). Los animales sedentarios

presentaron una tendencia a incrementar su ingesta, el peso corporal y la cantidad de grasa con respecto al grupo intacto; parámetros que pueden alterar la biosíntesis TRHérgica como lo mencionamos en la introducción, debido a esto decidimos realizar todas las comparaciones contra el grupo intacto.

Con base en estos parámetros físicos determinados en el modelo utilizado, podemos concluir que este es adecuado estudiar si el gasto energético puede modular el nivel de TRH y su RNAm en el SNC.

7.2 Actividad del eje HHT durante diferentes sesiones de ejercicio (ver anexo 3 y 4)

Existen varias evidencias que sugieren que las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo modulan la tasa de síntesis del TRH en respuesta a cambios en el gasto energético, como en condiciones de exposición a temperaturas bajas, durante la lactancia y ayuno (*Arancibia et al 1983, Zoller et al 1990, Uribe et al 1993, Rodeel et al 1991, Ishikawa et al 1994*); en el primer caso la actividad del eje se incrementa y las hormonas tiroideas junto con el sistema simpático incrementa la producción de calor a partir de la grasa parda café (*Arancibia et al 1983*) además de que la ingesta aumenta; por otra parte durante la lactancia y el ayuno existe un balance energético negativo producido por la demanda energética de la glándula mamaria y la falta de alimento, en ambas condiciones la actividad del eje tiroideo se encuentra disminuida.

En el ejercicio también se genera un balance energético negativo, ya que la ingesta está disminuida y el gasto energético está aumentado. Parecido a lo observado en la lactancia y ayuno, la síntesis de TRH está disminuida en el NPV desde la 3ª sesión hasta la 14ª. Debido a que los niveles circulantes de TSH y PRL no se afectan entre la 3ª y 7ª sesión podemos inferir que la TRH de la eminencia media continua liberándose, lo que se apoya también con la disminución en el contenido de TRH en HMB. La recuperación del TRH del HMB en la sesión 14 y la disminución en el nivel circulante de TSH y prolactina en la misma sesión pueden sugerir inhibición de la liberación de TRH en el acondicionamiento físico a largo plazo. Un evento importante fue lo observado en las hormonas tiroideas ya que no varían a pesar de los cambios en el nivel circulante de TSH, por lo que sería importante medir la actividad de las desiodasas. En el grupo sedentario disminuyó el nivel

de RNAm-TRH en el NPV y la TRH del HMB en la 3ª sesión mientras que la TSH se incrementó, estos cambios pueden producirse en respuesta al aislamiento, ya que se ha demostrado que el estrés psicológico inhibe el nivel de RNAm de TRH en el NPV (*Garcia 2006*). Además en ambos casos existen niveles altos de corticosterona que podrían también contribuir a disminuir la biosíntesis de TRH en las neuronas del NPV. En el grupo de la 1ª y 3ª sesión se observó niveles altos de corticosterona, lo que sugiere que tanto los animales sedentarios y ejercitados están respondiendo a un ambiente novedoso.

Una de las señales que podrían estar modulando negativamente a largo plazo la actividad de las neuronas TRHérgicas del NPV en el ejercicio sería el NPY debido a que reportes recientes del grupo de *Bi et al (2005)* y *Lewis et al (1993)* han mostrado que el NPY se incrementa en el núcleo arcuato y núcleo dorsomedial en ratas sometidas a un régimen de ejercicio moderado. Además, las neuronas TRHérgicas del NPV reciben proyecciones inmunoreactivas a NPY provenientes del arcuato y la aplicación icv de NPY inhibe la síntesis del RNAm de TRH en el NPV mediado por el receptor Y5 (*Fekete et al 2001*); por otro lado, las hormonas tiroideas y la corticosterona que pueden inhibir la biosíntesis de TRH en el NPV, se encuentran sin cambios en el día 7 y 14. También el NPY puede ser responsable de inhibir el efecto en la liberación de TRH del HMB en el día 14; *Harstrand et al (1987)* ha propuesto que el NPY induce la liberación de dopamina de la eminencia media y esta a su vez puede inhibir la liberación de TRH en esta región o bien puede ser un efecto directo de las proyecciones de las neuronas de NPY sobre las neuronas TRHérgicas, lo que también puede tener efecto en la liberación de TSH de los tirotrópos.

La leptina es liberada por el tejido adiposo y estimula la biosíntesis del TRH en una población de neuronas del NPV; si bien existen hallazgos contradictorios con respecto al nivel circulante de leptina durante el ejercicio, en general se ha observado que la leptina y sus receptores se encuentran disminuidos durante el ejercicio (*Bi et al 2005*). Esta hormona, también tiene efectos en el nivel de α MSH en el núcleo arcuato, péptido que estimula la síntesis del RNAm de TRH en el NPV (*Fekete et al 2000*). En conjunto podemos sugerir que las neuronas TRHérgicas del NPV pueden estar respondiendo a la señalización proveniente del núcleo arcuato.

En el ejercicio forzado o de alta intensidad se ha observado un aumento en la concentración de prolactina en sangre (*Sylvester et al 1989, Colborn et al 1991*), nosotros observamos una disminución significativa en la 14ª sesión, lo que puede ser un reflejo en la disminución en la liberación de TRH. Efectos opuestos sobre el nivel de prolactina pueden depender de la intensidad de ejercicio y estar relacionada con la respuesta del organismo a ejercicio de alta intensidad que no ocurre con el ejercicio moderado. Una gran demanda energética, genera un estado de estrés que conlleva un incremento importante en los niveles de citosinas circulantes (ILC-1 e ILC-6) y de corticosterona, que permita reestablecer la homeostasis del organismo. Existen numerosos estudios en ratas y humanos que tienen cambios en los niveles de diferentes hormonas en plasma asociadas con el ejercicio (*Galbo et al 1986, Howlett et al 1987*), sin embargo en algunos experimentos de ejercicio crónico (nado por 4 meses, *Woody et al 1998*) no se ha observado cambios en la T3 y T4 libre en plasma; las hormonas tiroideas en particular la triyodotironina puede estimular el metabolismo e incrementar la lipólisis del tejido adiposo y en combinación con catecolaminas aumentan la movilización de triacilglicérols de tejido adiposo (*Pucci et al 2000, McMurray 2005*), sin embargo en nuestros resultados no observamos cambios en la T4, y en T3; únicamente notamos una disminución en la primer sesión, lo que ya ha sido reportado en ejercicio de baja intensidad en el que la T3 disminuye sin observarse cambios en la TSH y T4, aunque hasta el momento no es claro el mecanismo por el cual esto ocurre (*Brabant et al 2005*). Es importante determinar la actividad de las deiodasas en nuestro modelo experimental para saber que está ocurriendo con las hormonas tiroideas ya que no observamos cambios a pesar de que el eje sé está inhibiendo, lo que podría hacer pensar que las deiodasas podrían estar teniendo efectos en dichas hormonas.

7.3 Actividad del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA) durante diferentes sesiones de ejercicio (ver anexo 3 y 4)

Las neuronas CRHérgicas del NPV funcionan como un integrador central de la respuesta al estrés; estudios previos han mostrado una gran variedad de condiciones estresantes tales como la inmovilización (*Covenas et al 1993, Imaki et al 1993*), aislamiento (*Hsu et al 1998, Kalin et al 1994*), choques eléctricos (*Imaki et al 1993, Pezzone et al 1992*), y estrés

psicológico usando cajas de comunicación (*Shibasaki et al 1993*) que activan las neuronas CRHérgicas del NPV.

El ejercicio, por los cambios homeostáticos que implica es una situación de estrés, por la cual el cuerpo debe mantener un nuevo equilibrio dinámico entre el sistema nervioso autónomo y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal para lograr el mantenimiento de la homeostasis y el equilibrio energético (*Yanagita et al 2007*). Se ha visto que durante el ejercicio forzado se aumenta considerablemente la activación de las neuronas CRHérgicas comparadas con el ejercicio voluntario, por lo que este último puede no ser un estresor importante (*Yanagita et al 2007*). En esta condición se encuentra nuestro modelo experimental, en el cual sólo observamos activación del eje en las primeras sesiones tanto en el grupo de ejercicio como en el sedentario, sugiriendo que los animales se estresan por el aislamiento.

Timofeeva et al (2003) reportó que el ejercicio físico agudo usando ruedas giratorias induce el aumento de la expresión del RNAm-CRH en el NPV; además el ejercicio dependiendo de la intensidad y duración induce la activación del el eje hipotálamo-hipófisis- adrenal que es iniciado por la activación de las neuronas CRHérgicas (*Vale et al 1981; Pacak 2000; Kawashima et al 2004; Chennaoui et al 2002; Farrell et al 1983*).

En reportes previos de ejercicio voluntario a corto plazo (4 a 7 días) no se han observado cambios en la expresión del RNAm-CRH en el NPV (*Kawaguchi et al 2005, Bi et al 2005*), mientras que en ejercicio voluntario a largo plazo (e.g. 4 semanas) disminuye la expresión de este mensajero un 20% aproximadamente (*Bi et al 2005, Droste 2003*) lo que implica que la respuesta del eje adrenal en el ejercicio depende de la intensidad del mismo. En el modelo de ejercicio voluntario utilizado en este trabajo, observamos diferentes niveles de expresión de RNAm-CRH dependiendo del tiempo de ejercicio. En la primera sesión se observa disminución que correlaciona con el incremento en el nivel de corticosterona. Posteriormente en la 7ª sesión donde el nivel de corticosterona es estable, pero los efectos en el peso y grasa corporal están estableciéndose, detectamos un incremento en el nivel de RNAm de CRH. En la sesión 14ª el nivel de RNAm de CRH desciende a su nivel más bajo, este es posiblemente el resultado del aumento en el nivel de NPY en el arcuato, el cual se sabe es responsable de inhibir la síntesis de CRH en el NPV (*Droste et*

al 2003). Se ha demostrado que los glucocorticoides incrementan la actividad lipolítica del tejido graso, inhiben el eje adrenal, contribuyen a no producir energía en exceso y disminuir el gasto de las reservas metabólicas de los organismos. Por otra parte, los glucocorticoides juegan un papel importante en la activación de la movilización de reservas energéticas durante la actividad física estimulando la glucólisis, promoviendo la lipólisis e incrementando el catabolismo proteico. Un gran número de estudios en diferentes especies de mamíferos reportan un incremento agudo en la concentración de glucocorticoides en plasma en respuesta a diferentes tipos de ejercicio, sin embargo el efecto del ejercicio crónico en la respuesta de glucocorticoides aun no es claro, mientras que en ejercicio agudo se ha observado que aumentan los niveles de corticosterona (B) en plasma (ver referencias en *Mantzoros et al 2005*), nosotros observamos un aumento de la concentración de corticosterona en la primera sesión del grupo sedentario con respecto al control, lo que puede estar siendo una respuesta al estrés de un nuevo ambiente o por el aislamiento, mientras que las ejercitadas presentan cambios fuertes en la tercera sesión donde aumentó 4 veces la concentración, estos experimentos se repitieron con dos lotes diferentes de ratas y se obtuvieron en promedio resultados similares por lo que pensamos que quizá este pico de respuesta al estrés a las 3 sesiones en las ratas ejercitadas. Es importante aclarar, que las ratas aisladas y las sometidas a ejercicio, se colocaron en grupos inmediatamente después de terminado el ciclo de actividad u oscuridad; esto provocó un comportamiento de mucho movimiento y acicalamiento entre los animales, que puede estar generando cambios independientes del ejercicio y el estrés. Será importante repetir los experimentos sin introducir esta variable, aunque se incremente el periodo de aislamiento y posiblemente el estrés psicológico.

Ha sido demostrado que el NPV y el núcleo central de la amígdala son sitios importantes de la acción central del CRH; el grupo de *Krahn et al (1988)* demostró que el CRH no sólo actúa como anoréxico sino también incrementa la locomoción al inyectarla en estas zonas, nosotros observamos un aumento de la expresión del RNAm-CRH a la sesión 7, que concuerda con un aumento del 63% de la distancia recorrida en promedio con respecto a la sesión 1 y 35% con respecto a la sesión 3, por lo que el aumento de RNAm-CRH podría estar induciendo el aumento en la locomoción.

Similar a lo reportado por otros autores, determinamos que el RNAm de CRH en el NPV se encuentra inhibido en condiciones de ejercicio voluntario crónico (14 sesiones), sin que se afecte en el nivel de corticosterona circulante.

La administración icv de CRH produce un potente efecto anoréxico en ratas. Por otra parte, la familia de péptidos similares a CRH, las urocortinas, también ha sido relacionada con alteraciones alimentarias. La administración icv de urocortina inhibe la ingesta de alimento en la rata mediante la disminución de NPY presentando incluso, un efecto más duradero que CRH en NPV, mientras que en términos de pérdida de peso la CRH es más potente, debido a lipólisis del tejido adiposo blanco, que no se presenta con urocortina. Los efectos anorexigénicos tanto de CRH como de urocortina son mediados por el receptor a CRH del tipo 2 (CRH-R2) Ratones con mutaciones en el gen *crh-r2* presentan mayor ingesta de alimento, no obstante muestran menor porcentaje de grasa corporal manteniéndose más delgados con respecto a ratones control (ver referencias en *Jaimés et al 2005*).

7.4 Cuantificación del contenido de TRH en diferentes regiones del Sistema Nervioso Central.

La TRH juega un importante papel en la regulación de la homeostasis energética no solo por sus efectos en la función tiroidea, sino también por sus efectos en el comportamiento alimenticio, la termogénesis, la activación locomotora y la regulación autonómica (ver referencias en *Joseph- Bravo 2004, Lechan et al, 2006, Jaimés 2006*); por lo que es interesante observar el contenido de TRH en regiones cerebrales involucradas en mantener estas condiciones.

La disección fue dividida en lados cerebrales para obtener una cuantificación más fina del contenido de TRH; de esta forma notamos diferentes cambios en el contenido de este péptido en condición de ejercicio voluntario; sin embargo, si bien el contenido de TRH puede ser una respuesta en conjunto, al medir por lados cerebrales se puede pensar que la lateralización está presente, ya que las diferencias significativas entre grupos no son replicables en ambos lados cerebrales (ver anexo 5, para ver resultados resumidos), sin embargo no todas corresponden al mismo lado y dado que solo tenemos el contenido de TRH y que pueden venir de otras regiones las inervaciones aun no podemos asegurar

que existe esta lateralización, por lo que sería necesario medir el RNAm-TRH en las regiones para saber realmente cuánto se está sintetizando y liberando en estas regiones.

Por otra parte, durante nuestros experimentos se observaron efectos similares en ratas ejercitadas como en sedentarias, dado que ambos grupos experimentales tienen el efecto del aislamiento también presentan un estímulo al reagruparlas lo que podría estar modificando el contenido de TRH en diferentes regiones que están involucradas en respuestas emocionales, por lo que creemos que este procedimiento de ejercicio voluntario que suponíamos evitaba la respuesta al estrés producido por el aislamiento total también podría estar generando un efecto a nivel neuroendócrino.

El hipotálamo juega un papel esencial en la regulación de la homeostasis energética, integrando señales de otras áreas del sistema nervioso central y de la periferia. La región que designamos **hipotálamo posterior** comprende los núcleos dorsomedial y ventromedial del hipotálamo, y observamos una disminución en el contenido de TRH a las 7 sesiones de ejercicio sin cambios en las demás sesiones. El núcleo dorsomedial tiene un papel fundamental en la homeostasis neuroendócrina y autonómica (*Bernardis et al 1998*) y ha sido implicado en una gran variedad de funciones incluyendo el comportamiento alimenticio, el peso corporal, la termorregulación, el ciclo circadiano, la función cardiovascular, actividad locomotora, estrés y reproducción (ver referencias en *Mihaly et al 2001*). En cuanto a su función en el gasto energético se ha demostrado que inyecciones de leptina en el hipotálamo dorsomedial (HDM) activa a esta región ya que se induce la expresión de c-Fos en distintas poblaciones celulares. También tiene diferentes conexiones con otras regiones hipotalámicas como el NPV ya que por inmunohistoquímica se ha visto las proyecciones del núcleo dorsomedial a las neuronas parvocelulares del NPV de neuronas sensibles a leptina (*Elmqvist et al 1998, Orban et al 1998, Seoane et al 2000*). El HDM contiene neurotransmisores y neuromoduladores que pueden tener control regulatorio sobre el eje tiroideo, como GABA, galanina, NPY, TRH, metionin-encefalina, sustancia P (*Iijima et al 1999; Jackson et al 1985; Levin et al 1987; Larsen, 1992*); la galanina y NPY muestran proyecciones directas al NPV, mientras que administraciones icv o sistémicas de GABA incrementan los niveles de TSH en suero, y al inhibir la síntesis de GABA o inyectando un antagonista del receptor de GABA se puede modificar el patrón de TSH en el ritmo circadiano (*Jordan et al 1983*). Por otra parte el

núcleo ventromedial hipotalámico (HVM) se ha definido como el centro de saciedad (Kong et al 2004, Abizaid et al 2006), recientes estudios han demostrado que esta región hipotalámica recibe muchas proyecciones de otras regiones hipotalámicas incluyendo el NPV y el HDM, y puede modular la liberación de señales orexigénicas de diferentes núcleos hipotalámicos (*Kalra et al 1999, Ter Horst et al 1987*); como el NPY, que en lesiones al HVM altera la expresión de este péptido en el núcleo arcuato y NPV (*Kalra et al 1997*). El grupo de *Shian et al 1985* al determinar la acción de la administración de TRH en el núcleo ventromedial hipotalámico notaron que causa la estimulación locomotora en ratas. También se ha demostrado que el incremento de T3 aumenta inmediatamente la expresión de genes tempranos en el hipotálamo ventromedial e induce un incremento de cuatro veces la toma de comida cuando es inyectada directamente en esta región hipotalámica (*Kong et al 2004*). Tomando en cuenta estos datos a pesar de que podríamos esperar un aumento en la concentración de TRH por la actividad locomotora, obtuvimos una disminución sólo a la sesión 7; que bien podría ser el efecto en el contenido de TRH por el aumento de la expresión de NPY, lo que ya ha sido descrito en el hipotálamo dorsomedial durante el ejercicio forzado a las 7 sesiones (*Kawaguchi et al 2005*) y en ejercicio voluntario a 4 semanas de ejercicio (*Bi et al 2005*); ya que además en ambos núcleos hipotalámicos (dorsomedial y ventromedial) se sabe que se expresa el NPY y que además libera a este péptido.

En el paradigma del ejercicio voluntario se ha observado que en el área caudal y posterior hipotalámicas, incluyendo la región medial ventral, y de la línea formada entre el **tracto mamilotalámico** y el fornix, ha mostrado una menor expresión de c-fos en ratas ejercitadas con respecto a ratas sedentarias; esta región hipotalámicas ha sido designada como el área de “defensa” y una región locomotora, ya que estimulaciones eléctricas y químicas de esta área produce el movimiento al correr y cambios en la función cardiorrespiratoria (*Waldrop et al 1988; Ichiyama et al 2002*), nosotros observamos que la TRH cuantificada en los cuerpos mamilares disminuyó en el grupo ejercitado a las 1^a, 7^a, y 14^a sesiones comparada con el grupo intacto, esta disminución también se presenta en sedentarios con respecto a los intactos a la sesión 1 y 14, lo que podría indicar que el efecto no es específico para la locomoción ya que también se presenta en los grupos sedentarios, por lo que lo que la TRH de esta región no está involucrado en el paradigma.

Estudios realizados por el grupo de *Hajnal et al 2000* demuestran que el **núcleo acumbens** participa manteniendo el balance energético en relación con el comportamiento alimenticio, también se le ha involucrado en mantener el peso corporal sugiriendo una posible función de interneuronas colinérgicas del núcleo acumbens. El TRH del núcleo acumbens está implicado también en la locomoción por la interacción de las neuronas dopaminérgicas en esta región (*Miyamoto y Nagawa, 1977; Yamamura et al 1991*), ya que al administrar un análogo de TRH (TA0910) estimula la actividad locomotora; contrario a estos estudios nosotros observamos en el día 1 una disminución del contenido de TRH contra los dos grupos y sólo es significativa contra sedentarios, mientras que al día 14 disminuye también al igual que el grupo sedentario; estudios realizados recientemente muestran que en restricción alimentaria y anorexia inducida por deshidratación (*de Gortari et al 2002, Jaimes 2006*) disminuye el contenido de TRH en esta región, por lo que podríamos pensar que es una respuesta a la disminución en la toma de comida.

Por otra parte sabemos que el ejercicio es un comportamiento práctico que activa cascadas celulares y moleculares que mantienen la plasticidad neuronal, lo que induce la expresión de genes asociados con la plasticidad tales como los que codifican para BDNF, y promotores adicionales en la vascularización cerebral, en la neurogénesis con cambios funcionales en la estructura neuronal y la resistencia al daño neuronal, básicamente esos efectos ocurren en el **hipocampo**, región central del aprendizaje y memoria (*Cotman et al 2002*). El hipocampo es un área que es particularmente susceptible al estrés (*Meaney et al 1993*) y está implicada en la memoria y el aprendizaje (*Horita et al 1989*), estudios recientes muestran que el ejercicio voluntario incrementa la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo, el cual puede además ser resultado de la liberación de factores de crecimiento (*e.g.* IGF-1, BDNF) en el cerebro (*Cotman et al 2002*). En nuestro modelo de ejercicio voluntario observamos que en esta región sólo presentó un aumento a la sesión 7 en el hipocampo anterior mientras en el hipocampo posterior no hay cambios significativos; esta respuesta a las 7 sesiones de ejercicio es consistente con la expresión de c-Fos que observaron en un experimento realizado por el grupo de *Lee (2003)*, ya que en ese grupo encontraron que iba aumentando la expresión de c-Fos al paso de las sesiones de ejercicio y para sesión 7 se observa el contenido máximo de la expresión de este gen temprano de transcripción en CA1, CA2, CA3 y giro dentado, para ir

disminuyendo hacia las 14, 21 y 28 sesiones de ejercicio sugiriendo que esta respuesta de restablecimiento puede ser por una adaptación celular en el cerebro (*Miyata et al 1995*). Hay reportes en los que se ha visto que en el hipocampo las neuronas TRHérgicas se activan sólo en el grupo entrenado para la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto en agua de Morris (*Aguilar-Valles et al., 2005 y 2006*), lo que podría indicar que a las 7 sesiones de ejercicio voluntario las neuronas TRHérgicas del hipocampo podrían estar sintetizando y liberando TRH, y además puede tener un efecto en el aprendizaje.

El **septum** muestra una alta sensibilidad al TRH en efectos al despertar y epilépticos (Kalivas and Horita, 1979; Schmidt, 1977; Horita et al. 1989). Se ha mencionado que el TRH activa los sistemas colinérgicos septo-hipocampal y basalcortical (*Horita et al, 1986*) aumenta la liberación de acetilcolina en el hipocampo (Hutson et al, 1990; Itoh et al, 1994). Contrario a lo observado en restricción de movimiento agudo donde el contenido de TRH disminuyó de manera específica por efecto de 7 días de restricción sin afectar los demás elementos TRHérgicas (García, 2006) nosotros observamos un aumento del contenido a la tercer sesión de ejercicio, este efecto puede ser respuesta a la actividad TRHérgica de respuesta al movimiento o bien por las proyecciones de otras regiones, ya que se sabe que en el septum el péptido maduro de TRH proviene de otras regiones como del hipotálamo lateral, del área preóptica y del núcleo basal de la estría terminal (Ishikawa et al, 1986) y así posiblemente estos cambios en el contenido de TRH sean el resultado de modulación del TRH en otras regiones del cerebro.

El **tálamo** tiene conexiones recíprocas con la corteza prefrontal (*Morgane et al., 2006*); formando parte del circuito del miedo y control de la ansiedad. Se sabe que la corteza prefrontal y el tálamo se activan, después de la administración i.c.v de TRH incrementando la expresión de c-fos (*Otake et al., 2000*). Nosotros observamos una disminución a la sesión 7 en ratas ejercitadas y sedentarias, lo que no daría una respuesta específica al modelo y bien podría ser reflejo de la respuesta al miedo o la ansiedad.

El **lóbulo neurointermedio** está constituido por terminales nerviosas de la zona magnocelular del NPV y del supraóptico, En esta región obtuvimos una respuesta similar

al HMB en el contenido de TRH por lo que podemos inferir que este cambio es un reflejo de lo que esta ocurriendo en el NPV.

En el **área preóptica y amígdala** no encontramos cambios, lo que nos podría decir que el ejercicio voluntario o de baja intensidad como el que realizamos en nuestro protocolo no se altera en forma importante la actividad termogénica (*Nagashima et al 2000*) ni cardiovascular (*Sharif et al 1985*) que pudiera influenciar el contenido de la TRH en el área preóptica y en el consumo de alimento o estrés en el caso de la amígdala (*Kelley et al 2004*).

7.5 RNAm-TRH en Núcleos del Rafe y área gris periacueductal

Diversos reportes muestran que el hipotálamo no es la única región involucrada en la regulación metabólica, el tallo cerebral es una estructura central primaria que controla el metabolismo y donde el TRH juega un papel en la regulación de la homeostasis energética integrando el balance endocrino y simpático/vagal.

El tallo cerebral es esencial para mediar la respuesta energética del hambre. La TRH del tallo cerebral es sintetizada en el núcleo caudal del Rafe invirtiendo el tallo cerebral y las neuronas motoras simpáticas y las vagales espinales, también es sintetizado en el rafe pallidus, rafe obscurus, las regiones piramidales, núcleos que se sabe que sus neuronas vagales y simpáticas están involucradas en la regulación térmica, cardiovascular, gastrointestinal y pancreática (*Berthoud et al 2005, Yang et al 2002*). Hay reportes de que el RNAm-TRH y su receptor 1 en tallo cerebral se incrementa casi 60% en ratas en ayuno, la acción orexigénica del TRH en el tallo cerebral es mediada por la estimulación vagal-colinérgica y la liberación de ghrelina gástrica, lo que evidencia que el TRH participa en regular el metabolismo alterado por la demanda energética (*Ao et al 2006*).

Estudios recientes de ejercicio voluntario muestran disminución de la expresión de c-fos en el área gris periacueductal y del Rafe, aunque este último no es significativo (*Ichiyama et al 2002*); el área gris periacueductal está involucrada en funciones cardiorrespiratorias incluyendo hipertensión y taquicardia en la porción lateral (*Bandler et al 1985, Bandler et al 1988, Bandler et al 1994, McDougall et al 1985*) e hipotensión y bradicardia en la región más caudal y ventrolateral (*Bandler et al 1994*); también ha sido demostrado que en esta

región la TRH, bombesina y somatostatina inducen la estimulación de la contracción gástrica (Tache et al 1990).

Los cambios en el RNAm de TRH en esta región fueron modestos, y se encontró que en general el ejercicio incrementa el nivel de RNAm de TRH, lo que puede correlacionar con un incremento en la ingesta de alimento durante el periodo de reposo. Sin embargo, cambios similares se observaron en el grupo sedentario de la 3ª sesión, en los cuales la ingesta en reposo no se modifica. Es importante realizar una disección más fina o bien *hibridación in situ* para inferir la participación del TRH en éstos núcleos.

7.6 Conclusión.

En resumen, se confirma que el ejercicio voluntario o de baja intensidad es capaz de incrementar el gasto energético, inhibe la ingesta y disminuye en el peso corporal. Esto inhibe la biosíntesis del RNAm de TRH y CRH en las neuronas del NPV en las sesiones 7 y 14. En las primeras sesiones, parece ser importante el componente del estrés, lo que altera la actividad hormonal de las ratas. Finalmente, nuestros resultados sugieren que la actividad de TRH se inhibe en condiciones donde el gasto energético es negativo, como se ha propuesto en otras condiciones similares.

ANEXO 1

Preparación del agua libre de RNAsas.

En todas las soluciones utilizadas para la extracción de RNAm se utilizo agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC Sigma). El procedimiento consistió en hacer una suspensión al 0.01% de DEPC en agua deionizada, mezclando el DEPC por 12 h mediante agitación, después se esterilizó por 2 ciclos para lograr la eliminación de DEPC, posteriormente se filtro (filtro 0.22nm) para así obtener el agua libre de RNAsas, tomamos alícuotas en condiciones de esterilidad (utilizando mechero de Fisher), el agua libre de RNAsas se mantuvo en refrigeración a 4° C.

ANEXO 2

SECUENCIAS DE OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS PARA LA PCR

Oligo de T

Secuencia (5' - 3'): **TTT TTT TTT TTT TTT**

Secuencia (3' - 5'): **AAA AAA AAA AAA AAA**

Longitud: 15

Ciclofilina.

Secuencia (5'-3'): **GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA**

Secuencia (3'-5'): **CCC CTC TTT CCT AAA CCG AT**

Longitud: 20

TRH

Secuencia (5'-3'): **GAC AGC TAG TGA AGG GAA CAG G**

Secuencia (3'-5'): **CTG TCG ATC ACT TCC CTT GTC C**

Longitud: 22

CRH

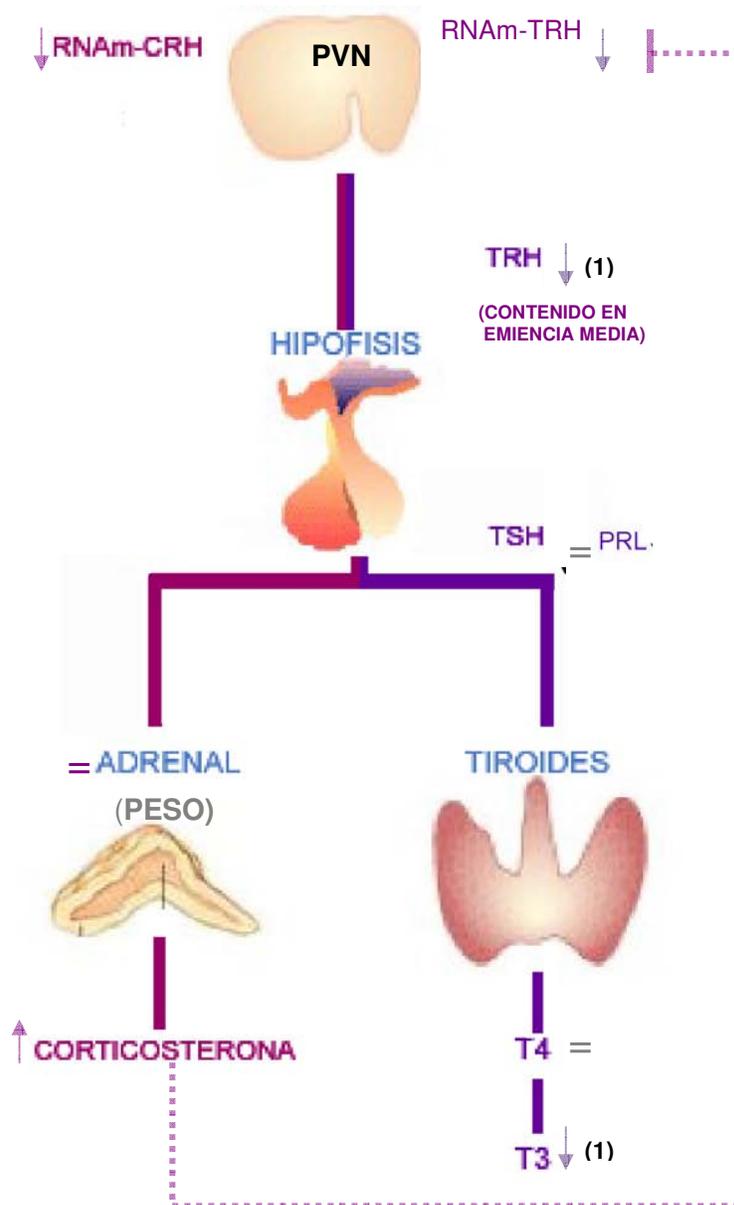
Secuencia (5'-3'): **GAC CGC CTC TCC CTC TCC AG**

Secuencia (3'-5'): **CTG GCG GAG AGG GAG AGG TC**

Longitud: 20

Anexo 3.

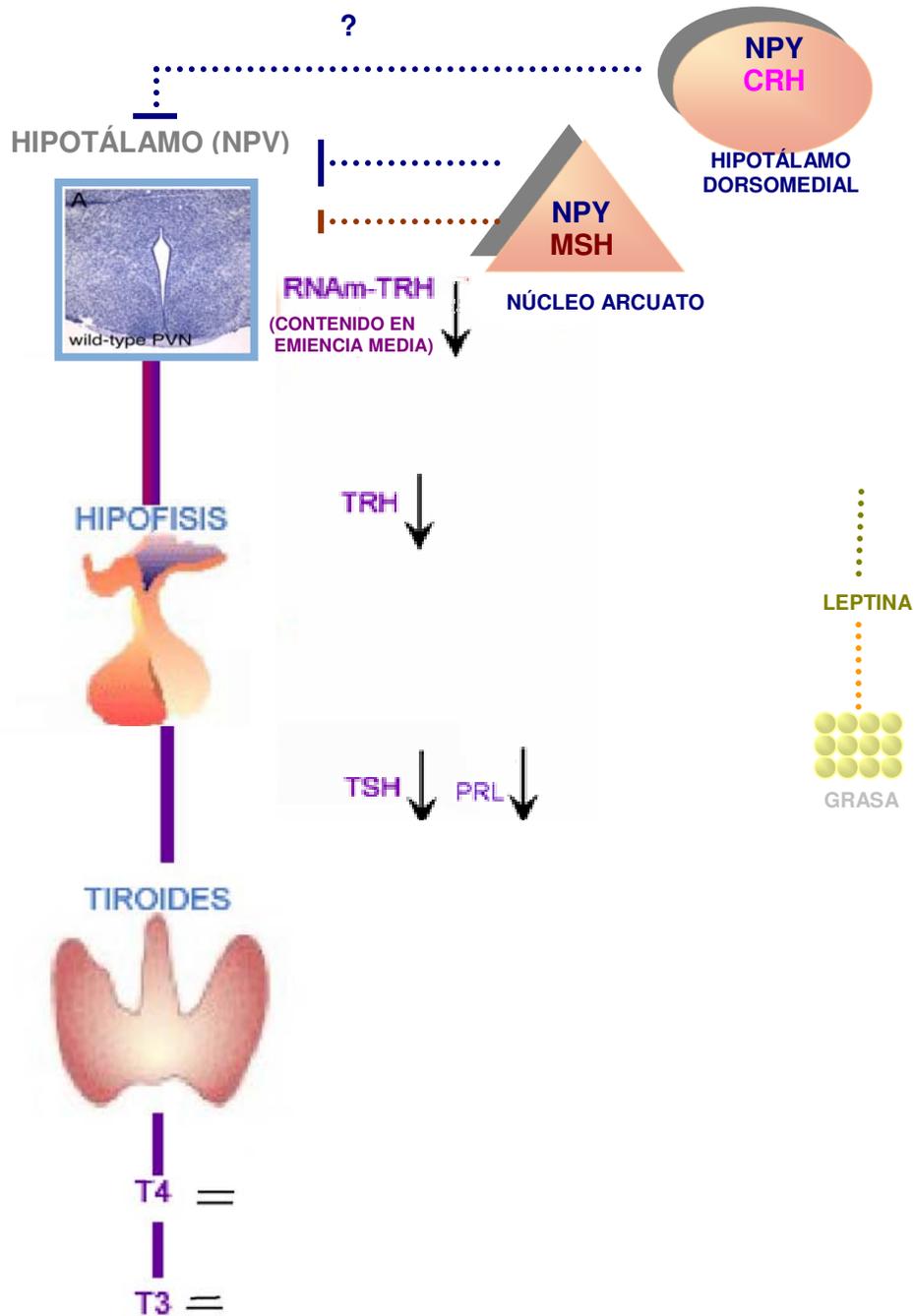
Efectos del ejercicio voluntario en la actividad del eje HHT (derecha) y el eje adrenal (izquierda) **a corto plazo** (1 y 3 sesiones de ejercicio).



↑ Aumento ↓ Disminución = Sin cambios 1: 1 sesión, 3: 3 sesiones. TRH: Hormona Liberadora de Tirotopina, TSH: Tirotopina, PRL: Prolactina, T4: Tiroxina, T3: Triyodotironina, CRH: Hormona Liberadora de corticotropina, NPV: Núcleo Paraventricular

Anexo 4

Efectos del ejercicio voluntario en la actividad del eje HHT (derecha) y el eje adrenal (izquierda) a **largo plazo** (7 y14 sesiones de ejercicio).



↑ **Aumento** ↓ **Disminución** = Sin cambios **7: 7 sesiones 14: 14 sesiones**. TRH: Hormona Liberadora de Tirotrópina, TSH: Tirotrópina, PRL: Prolactina, T4:Tiroxina, T3: Triyodotironina, CRH:Hormona Liberadora de corticotropina, GABA; Gama Amino-butirico, NPY: Neuropeptido Y, MSH:Hormona Liberadora de melanocortina, NPV: Núcleo Paraventricular

8. REFERENCIAS

- Abizaid A, Gao Q, Horvath TL. (2006) *Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance*. Neuron. 21;51: 691-702.
- Adlar P.; Perreau V.; Engesser-Cesar C.; Cotman C. (2004) *The time course of induction of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus following voluntary exercise*. Neuroscience Letters 363: 43-48.
- Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, Balderas I, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F, Joseph-Bravo P. (2005) *Analysis of the stress response in rat trained in the water maze: Differential expression of corticotropin-releasing-hormone, CRH-R1, glucocorticoids receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions*. Neuroendocrinol; 82:306-319.
- Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, Garcia-Vazquez AI, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F, Joseph-Bravo P. (2006) *The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze*. Neurochem Int. 48(1):31-42.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting* (1996) Nature. 18;382:250-2.
- Al-ArabiA., and Andrews J.F. (2003) *Effect of the chonic periferal administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) and noradrenaline (NA), separately and combined, on food intake, body weight, metabolic rate of warm acclimated rats*. Irish J. Food Sci Tech 10:190-191.
- al-Damluji S (1993) *Adrenergic control of the secretion of anterior pituitary hormones*. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 7(2):355-92.
- Ao Y, Go VL, Toy N, Li T, Wang Y, Song MK, Reeve JR Jr, Liu Y, Yang H. (2006) *Brainstem thyrotropin-releasing hormone regulates food intake through vagal-dependent cholinergic stimulation of ghrelin secretion*. Endocrinology Dec;147 (12):6004-10.
- Arancibia S, Tapia-Arancibia ., Assenmacher I., Astier H.(1983) *Direct evidence of short – term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats*. Neuroendocrinology 64. 257-267,

- Arancibia S., Tapia-Arancibia, L., Astier, H and Assenmacher, I. (1989) *Physiological evidence for alpha 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of median eminence*. *Neurosci. Lett* 100:169-174.
- Backhouse S., Biddle S., Williams C. (2007) *The influence of water ingestion during prolonged exercise on affect*. *Appetite* 48 193–198
- Bagnasco M, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP. (2002) *Evidence for the existence of distinct central appetite, energy expenditure, and ghrelin stimulation pathways as revealed by hypothalamic site-specific leptin gene therapy*. *Endocrinology*. Nov; 143:4409-21.
- Bandler, M.T. Shipley, (1994) *Columnar organization at the midbrain periaqueductal gray: Modules for emotional expression?*, *Trends Neurosci.* 9 379–389.
- Bandler, P. Carrive, (1988) *Integrated defence reaction elicited by amino acid microinjection in the midbrain periaqueductal grey region of unrestrained cats*. *Brain Res.* 439 95–106.
- Bandler, S. Prineas, T. McCulloch. (1985) *Further localization of midbrain neurones mediating the defense reaction in the cat by microinjection of excitatory amino acids*, *Neurosci. Lett.* 56 311–316.
- Benoit S, Schwartz M, Baskin D, Woods SC, Seeley RJ. (2000) *CNS melanocortin system involvement in the regulation of food intake*. *Horm Behav.* 37:299-305.
- Bernardis, L.L. Bellinger, (1991) *Brown (BAT) and white (WAT) adipose tissue in high-fat junk food (HFJF) and chow-fed rats dorsomedial hypothalamic lesions (DMNL rats)*, *Behav. Brain Res.* 43 191–195.
- Bernardis, L.L. Bellinger. (1998) *The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218. 284–306
- Berthoud HR, Patterson LM, Sutton GM, Morrison C, Zheng H (2005) *Orexin inputs to caudal raphe neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation*. *Histochem Cell Biol* 123: 147-156
- Bi Sheng, Scott, Hyun J. (2005) *Running Well activity Prevents Hyperphagia and obesity in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty Rats: Role of Hypothalamic Signalling*. *Endocrinology* 146: 1676-1685,
- Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA (2005) *Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure*. *Biosci Rep.* 25:191-208.

- Bianco, A.C, and Silva J.E. (1987) *Optimal response of key enzymes and uncoupling protein to cold in BAT depends on local T3 generation*. Am J. Physiol., 253: E255-E256.
- Bjørge T, Engeland A, Tretli S and Weiderpass E. (2006) *Body size in relation to cancer of the uterine corpus in 1 million Norwegian women* Wiley-Liss, Inc. int. J. Cancer 120, 378-383
- Bordeaux BC, Bolen S, Brotman DJ. (2006) *Beyond cardiovascular risk: the impact of obesity on cancer death*. Cleve Clin J Med. 73:945-50
- Boschi G, Rips R. (1981) *Effects of thyrotropin releasing hormone injection into different loci of rat brain on core temperature* . Neuroscience Lett; 23:93-8.
- Brackett DJ, Schaefer CF, Lerner MR, Holaday JW, Fagraeus L, Wilson MF. (1990) *Evaluation of thyrotropin releasing hormone as a therapeutic intervention for endotoxemia*. Regul Pept. 30;29:153-62.
- Bray GA, Paeratakul S, Popkin BM. (2004) *Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies*. Physiol Behav. 30;83:549-55.
- Brobeck JR (1946) *Mechanisms of the development of obesity in animals with hypothalamic lesions*. Physiol Rev 26:541–559
- Broberger C, McCormick DA. (2005) *Excitatory effects of thyrotropin-releasing hormone in the thalamus*. J Neurosci; 25:1664-1673
- Broberger C. (2005) *.Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks*. Journal of Internal Medicine: 258; 301-327
- Brody MJ. (1988) *Central nervous system and mechanisms of hypertension*. Clin Physiol Biochem.6:230-9.
- Bulow J (2004) *Physical activity and adipose tissue metabolism*. Scand J Med Sci Sports 14:72–73.
- Cao J, O'Donnell D, Vu H, Payza K, Pou C, Godbout C, Jakob A, Pelletier M, Lembo P, Ahmad S, Walker P. (1998) *Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor*. J Biol Chem. Nov 27;273:32281-7.
- Carlson MJ, Cummings DE. (2006) *Prospects for an anti-ghrelin vaccine to treat obesity*. Mol Interv. Oct;6:249-52.
- Carvalho SD, Negrao N, Bianco AC (1993) *Regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue*. Am J Physiol. 264:E874-81.

- Carvalho, E.T. Kimura, A.C. Bianco, J.E. Silva, (1991) *Central role of brown adipose tissue thyroxine 5-deiodinase on thyroid hormone- dependent thermogenic response to cold*, *Endocrinology* 128 :2149–2159
- Chen , P.;Li C.; Haskell-Luevano, C.; Smith M.S. (1999) *Altered expression agouti-related protein and its co- localization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation*. *Endocrinology* 140: 2645-2350
- Chennaoui, M., Gomez-Merino, D., Lesage, J., Drogou, C., Guezennec, C., (2002). *Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary adrenal axis in rats*. *Acta Physiologica Scandinavica* 175,113–121.
- Chomczynski and Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate– phenol –chloroform extraction* (1987). *Analytical Biochemistry* 162:156–159
- Coker RH, Kjaer M. (2005) *Glucoregulation during exercise: the role of the neuroendocrine system*. *Sports Med.*;35:575-83
- Colborn D, Thompson D, Rahmanian M, Roth T. (1991) *Plasma concentrations of cortisol, prolactin, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in stallions after physical exercise and injection of secretagogue before and after sulpiride treatment in winter*. *J Anim Sci*. 69:3724-3732:69,
- Comizio R, Pietrobelli A, Tan Y, Wang Z, (1998) *Total body lipid and triglyceride response to energy deficit: relevance to body composition models* *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274:860-866.
- Cotman CW, Berchtold NC. (2002) *Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity*. *Trends Neurosci*. 25:295-301.
- Covarrubias L, Uribe RM, Mendez M, Charli JL, Joseph-Bravo. (1988) *Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels*. *Biochem Biophys Res Commun*. 151:615-22.
- Covenas, R., de Leon, M., Cintra, A., Bjelke, B., Gustafsson, J. Fuxe, K. (1993) *Coexistence of c-Fos and glucocorticoid receptor immunoreactivities in theCRF immunoreactive neurons of the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat after acute immobilization stress*. *Neuroscience Letters* 149, 149–152.
- Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD. (1999) *Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic*

- paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat.* Neuron 24:155-63.
- Curioni C, Andre C. (2006) *Rimonabant for overweight or obesity.* Cochrane Database Syst Rev. Oct 18;(4):CD006162.
- de Gortari P, Cisneros M, Medellin MA, Joseph-Bravo P. (2002) *Chronic ingestion of ethanol or glucose solutions affects hypothalamic and limbic TRH metabolism in dams and their pups.* Neurochem Int. 41:237-49.
- Dishman RK, Berthoud and coaut. (2006) *Neurobiology of exercise.* Obesity (Silver Spring) 14: 345-56
- Droste SK, Gesing A, Ulbricht S, Muller MB, Linthorst AC, Reul JM (2003) *Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.* Endocrinology.144:3012-23.
- Elmquist, R.S. Ahima, C.F. Elias, J.S. Flier, C.B. Saper. (1998) *Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 741–746.
- Engeland A, Bjorge T, Tverdal A. Sogaard AJ. (2004) *Obesity in adolescence and adulthood an the risk of adult mortality.* Epidemiology 14:79-85..
- Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD. (1996) *Sensitivity to leptin and seizures of mice lacking neuropeptide Y.* Nature 381:415-421,
- Farrell, P., Garthwaite, T., Gustafson, A., (1983) *Plasma adrenocorticotropin and cortisol responses to submaximal and exhaustive exercise.* Journal of Applied Physiology 55, 1441–1444.
- Feduic S, Campbell J, Riddell M. (2006) *Effect of voluntary wheel running or circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats.* J Appl Physioñ 100:1867-1875
- Fekete C, Kelly J, Mihaly E, Sarkar S, Rand WM, Legradi G, Emerson CH, Lechan RM. (2001) *Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis.* Endocrinology. 142:2606-13.
- Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, Emerson CH, Lechan RM. (2000) *alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression.* J Neurosci. 20 :1550-8.

- Fekete C, Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM. (2002) *GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat*. Brain Res. Dec 13;957:251-8.
- Fekete C. (2002) *Agouti-Related Protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic- pituitary-thyroid (HTP) axis; comparisons between the Effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HTP axis*. Endocrinology 143:3846-3853
- Fekete C. Sarrar S. Lechan R. (2005) *Relative contribution of brainstem afferents to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN)* Brain Research 1032 171-175
- Fekete C., Milhaky E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen J.T. Mao, Q., Rand W.M. Moss L.G., Emerson, C.H., Jackson i.M. and Lechan R.M. (2000) *Association of cacaines and amphetamine-regulated transcript –immunoreactive elements whit thyrotropin – releasing hormone-sinthesizing neurons in the hypotalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hipotalamic-pituitary-thyroid axis during fasting*. J. Neurosci. 20:9224-9234.
- Galbo H. (1986) *The hormonal response to exercise*. Diabetes Metab Rev.;1:385-408.
- Garcia S. Pirola C. (2005) *Thyrotropin-releasing hormone in cardiovascular pathophysiology*. Regulatory Peptides 128: 239-246
- García Vázquez Arlene Iskra. (2006) *El estrés psicológico modula la actividad de las neuronas TRHérgicas en el sistema límbico*. Tesis de Maestria en Ciencias UNAM
- Gerald C, Walker MW, Criscione L, (1996) *A receptor subtype involved in neurooptide-Y-induced food intake*. Nature 382:168-171
- Goodridge AG. (1978) *Regulation of malic enzyme synthesis by thyroid hormone and glucagon: inhibitor and kinetic experiments*. Mol Cell Endocrinol. Jun;11:19-29.
- Guillemin R. Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Ward DN, Vale W, (1970) *Characterization of ovine hypothalamic hipophysiotropic TSH-releasing factor*. Nature.Apr 25;226 (5243) :321-5 1970
- Gutiérrez Mariscal Mariana, (2005) *Participación de la Hormona Liberadora de Tiroropina en la Conducta de Ansiedad*. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestria, 75 p.p

- Haasteren Van , G. A. C.; Van Toor, H.; Visse, T. J ; De Greef W.J. (1996) *Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotropin secretion during lactation.* J Endocrinol. 148:325-336,
- Haasteren Van G.A.; Linkels, E.; Klootwijk, W.; Van Toor, H.; Rodeel, J.M. (1995) *Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (Pro-TRH) mRNA and the hypothalamic release of ProTRH-derived peptides: role of the adrenal gland.* J. Endocrnol 145:143-15
- Haasteren Van GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. (1996) *Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats.* J Endocrinol. 150:169-78.
- Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ. (2000) *Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 279:R47-52.
- Haisendeder D.J. Ortalano; Dalking A. C. Yasing. M. Marshall J. (1992) *Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression in prolactin in the lacting rat.* Endocrinology 130: 29-2923,
- Hajnal A, Szekely M, Galosi R, Lenard L. (2000) *Accumbens cholinergic interneurons play a role in the regulation of body weight and metabolism.* Physiol Behav. 1-15;70:95-103.
- Harfstrand A, Eneroth P, Agnati L, Fuxe K. (1987) *Further studies on the effects of central administration of neuropeptide Y on neuroendocrine function in the male rat: relationship to hypothalamic catecholamines.* Regul Pept.17:167-79.
- Hartmann PE, Sherriff JL, Mitoulas LR. (1998) *Homeostatic mechanisms that regulate lactation during energetic stress.* J Nutr. 128 :394S-399S. Review.
- Harvey S. (1990) *Thyrotrophin-releasing hormone: a growth hormone-releasing factor.* J Endocrinol.125:345-58.
- Haskell-Luevano C, Monck EK. (2001) *Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor.* Regul Pept. May 5;99:1-7.
- Hofbauer KG, Nicholson JR. (2006) *Pharmacotherapy of obesity.* Exp Clin Endocrinol Diabetes.114:475-84.

- Hökfelt et al., T. Hökfelt, Y. Tsuruo, B. Ulfhake, S. Cullheim, U. Arvidsson, G.A. Foster, M. Schultzberg, M. Schalling, L. Arborelius, J. Freedman, C. Post and T. Visser (1989) *Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds*, Ann. NY Acad. Sci. 553 , pp. 76–105
- Horita A. (1998) *An update on the CNS actions of TRH and its analogs*. Life Sci.;62:1443-8.
- Horita, A., Carino, M.A., Zabawska, J., Lai, H., (1989) *TRH analog MK-771 reverses neurochemical and learning deficits in medial septal-lesioned rats*. Peptides 10, 121±124.
- Hou TD, Du JZ. (2005) *Norepinephrine attenuates hypoxia-inhibited thyrotropin-releasing hormone release in median eminence and paraventricular nucleus of rat hypothalamus*. Neuro Endocrinol Lett. 26:43-9.
- Howlett TA. (1987) *Hormonal responses to exercise and training: a short review*. Clin Endocrinol (Oxf). 26:723-42.
- Hsu, D., Chen, F., Takahashi, L., Kalin, N. (1998) *Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis*. Brain Research 788, 305–310
- Hutson PH, Semark JE, Middlemiss DN. (1990) *The TRH analogue MK-771, increases acetylcholine release in hippocampus but not striatum of the conscious rat*. Neurosci Lett. 14;116:149-55
- Ichiyama R, Gilbert A, Waldrop T, Iwamoto G. (2002) *Changes in the exercise activation of diencephalic and brainstem cardiorespiratory areas after training*. Brain Research 947 225-233,.
- Iijima, Y. Kataoka, K. Kakihara, H. Bamba, Y. Tamada, S. Hayashi, T. Matsuda, M. Tanaka, H. Honjyo, M. Hosoya, S., Hinuma, Y. Ibata, (1999) *Cytochemical study of prolactin-releasing peptide (PrRP) in the rat brain*, Neuroreport 10 1713–1716.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Hotta, M., Demura, H., (1993) *Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress*. Brain Research 616, 114–125.
- Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. (2003) *Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin*,

- but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. Neuroendocrinology. 78 :321-30.*
- Ishikawa K, Kakegawa T, Suzuki M. (1994) *Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in the secretion of thyrotropin under adrenergic and cold-stimulated conditions in the rat. Endocrinology.114:352-8.*
- Ishikawa K, Taniguchi Y, Kurosumi K, Suzuki M. (1986) *Origin of Septal Thyrotropin-Releasing Hormone. Neuroendocrinology; 44:54-58.*
- Itoh Y, Ogasawara T, Mushiroy T, Yamazaki A, Ukai Y, Kimura K. (1994) *Effect of NS-3, a thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo acetylcholine release in rat brain: regional differences and its sites of action. J Pharmacol Exp Ther. 271:884-90.*
- Jackson I. M. (1983) *Thyrotropin- Releasing Hormone (TRH): Distribution in Mammalian species and its functional significance, in: Thyrotropin-Releasing Hormone Edit. Griffiths E. C., Bennett G. W., Raven Press New York, pp 3-18*
- Jackson, P. Wu, R.M. Lechan, (1985) *Immunohistochemical localization in the rat brain of the precursor for thyrotropin-releasing hormone, Science 229 1097–1099.*
- Jaimes Hoy Lorraine Elizabeth. (2006) *Efectos en la anorexia por deshidratacion en la expresion de los genes de TRH, CRH y sus receptores en el sistema limbico. Tesis de maestria en ciencias bioquimicas UNAM.*
- Jeukendrup A.E. (2003) *Modulation of carbohydrate and fat utilization by diet, exercise and environment Biochemical Society Transactions 31(6):1270-3.*
- Jordan, C. Poncet, M.Veisseire, R. Mornex, (1983) *Role of GABA in the control of thyrotropin secretion in the rat, Brain Res. 268 105–110.*
- Joseph-Bravo P. (2004) *Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone neurons as transducers of energy homeostasis. Endocrinology. Nov;145(11):4813-5Review.*
- Kakucska I, Rand W, Lechan RM.(1992) *Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by both triiodothyronine and thyroxine. Endocrinology 130:2845-50*
- Kalin, N., Takahashi, L., Chen, F., (1994). *Restraint stress increase corticotropin releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. Brain Research 656, 182–186.*
- Kalivas PW, Horita A. (1979) *Thyrotropin-releasing hormone: central site of action in antagonism of pentobarbital narcosis. Nature. 29;278:461-3*
- Kalra PS, Dube MG, Xu B, Kalra SP 1997 *Increased receptor sensitivity to neuropeptide Y*

- in the hypothalamus may underlie transient hyperphagia and body weight gain. *Regul Pept* 72:121–130
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS 1999 Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20:68–100
- Karydis I, Tolis G. (1998) *Orexis, anorexia, and thyrotropin releasing hormone*. *Thyroid*. 8:947-50.
- Kawaguchi M, Scott K., Moran T, Bi S. (2005) *Dorsomedial hypothalamic corticotropin-releasing factor mediation of exercise-induced anorexia*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1800-R1805
- Kawashima, H., Saito, T., Yoshizato, H., Fujikawa, T., Sato, Y., McEwen, B., Soya, H., (2004) *Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running* *Life Sci*. 31;76:763-74.
- Kelley AE. (2004) *Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning*. *Neurosci Biobehav Rev*. Jan;27(8):765-76. Review.
- Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghatei MA, Bloom SR. (2000) *The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin*. *J Clin Invest*. 105:1005-11
- Klein S, Sheard NF, Pi-Sunger X, Daly A, Wylie-Roselt J, Kulkarni K, Clark NG (2004). *Weight manage thought lifestyle modification for the prevention and manage of type 2 diabetes rationale and strategies*. A statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of obesity and the American Society for Clinical Nutrition. *Am J Nutr*; 80: 257-263.
- Knight CH; (2001) *Lactation and gestation in dairy cows: flexibility avoids nutritional extremes*. *Proc Nutr Soc*. 60:527-37.
- Kong WM, Martin NM, Smith KL, Gardiner JV, Connoley IP, Stephens DA, Dhillo WS, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. (2004) *Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure*. *Endocrinology*. 145:5252-8.
- Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. (1988) *Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects*. *Brain Res*. Mar 8;443:63-9.

- Larsen, (1992) Distribution of substance P-immunoreactive elements in the preoptic area and the hypothalamus of the rat, *J. Comp. Neurol* 316:287–313
- Larue-Achagiotis C, Rieth N, Gubern M, Laury MC, Louis-Sylvestre J. (1995) Exercise-training reduces BAT thermogenesis in rats. *Physiol Behav* 57:1013-7.
- Lechan RM, Fekete C. (2004) *Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome*. *J Endocrinol Invest*. 27: 105-19.
- Lechan RM, Fekete C. (2006) *The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism*. *Prog Brain Res*.153:209-35.
- Lechan RM, Fekete C. (2006a) *Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis*. *Peptides*. 27:310-25.
- Lechan RM, Wu P, Jackson IM. (1987) *Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone*. *Endocrinology*. 121:1879-91
- Lee GC, Yang IM, Kim BJ, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Choi YK. (1996) Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene. *Korean J Intern Med*. 11:138-44.
- Lee TH, Jang MH, Shin MC, Lim BV, Kim YP, Kim H, Choi HH, Lee KS, Kim EH, Kim CJ. (2003) Dependence of rat hippocampal c-Fos expression on intensity and duration of exercise. *Life Sci*. 7;72:1421-36
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. (1997) *Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus*. *Endocrinology* 138:2569-76.
- Levin, P.E. Sawchenko, P.R. Howe, S.R. Bloom, J.M. Polak, (1987) *Organization of galanin-immunoreactive inputs to the paraventricular nucleus with special reference to their relationship to catecholaminergic afferents*, *J. Comp. Neurol*. 261 562–582.
- Levitsky DA. (1970) *Feeding patterns of rats in response to fasts and changes in environmental conditions*. *Physiol Behav* 5: 291–300
- Lewis DE, Shellard L, Koeslag DG, Boer DE, McCarthy HD, Mc- Kibbin PE, Russell JC, and Williams G. (1993) *Intense exercise and food restriction cause similar hypothalamic neuropeptide Y increases in rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*

- 264: E279–E284,
- Looy H and Eikelboom R. (1989) Wheel running, food intake, and body weight in male rats. *Physiol Behav* 45: 403–405,
- Luo L, MacLean DB. (2003) Effects of thyroid hormone on food intake, hypothalamic Na/K ATPase activity and ATP content. *Brain Res.* May 30;973(2):233-9.
- Mantzoros CS, Fredericch RC, QU Daqing R, Lowell BB, Maratos-Flier JF. (1998) *Severe leptin resistance in brown fat-deficient uncoupling protein promoter-driven diphtheria toxin A mice despite suppression of hypothalamic neuropeptide Y and circulating corticosterone concentrations* . . *Diabetes* 47:230-8.
- Martinez JA, Fruhbeck G. (1996) *Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches*. *Rev Esp Fisiol.* 52:255-8.
- Mayer J. (1955) *Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis*. *Ann N Y Acad Sci.* 15;63:15-43.
- McDougall, R.A.L. Dampney, R. Bandler. (1985) *Cardiorespiratory components of the defence reaction evoked by excitation of neuronal cell bodies in the midbrain periaqueductal grey in the cat*. *Neurosci. Lett.* 60 69–75
- McMurray RG, Hackney AC. (2005) *Interactions of metabolic hormones, adipose tissue and exercise*. *Sports Med.* 35:393-412.
- Meaney, M.J., Bhatnagar, S., Larocque, S., McCormick, C., Shanks,N., Sharma, S., Smythe, J., Viau, V., Plotsky, P.M. (1993). *Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system*. In: TacheÂ , Y., Rivier, C. (Eds.), *Corticotropin-Releasing Factor and Cytokines: Role in the Stress Response*, Annals of the New York Academy of Sciences, New York. vol. 697, pp. 70±85
- Medina-Gomez G, Calvo RM, Obregon MJ. (2004) *T3 and Triac inhibit leptin secretion and expression in brown and white rat adipocytes*. *Biochim Biophys* 1;1682:38-47
- Mendez M, Joseph-Bravo P, Cisneros M, Vargas MA, Charli JL. *Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain*. *Peptides.* 1987 Mar-8:291-8
- Mihaly E, Fekete C, Legradi G, Lechan R. (2001) *Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropinreleasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus* *Brain Research* 891 20–31

- Mitsuma T, Nogimori T, Hirooka Y. (1987) *Effects of growth hormone-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone on the release of thyrotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro*. *Exp Clin Endocrinol*. 90:365-8.
- Miyamoto, M., Nagawa, Y. (1977) *Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats*. *Eur. J. Pharmacol*. 44, 143±152.
- Miyata S, Ishiyama M, Shido O, Nakashima T, Shibata M, Kiyohara T. (1995) *Central mechanism of neural activation with cold acclimation of rats using Fos immunohistochemistry*. *Neuroscience Research* 22:209–18.
- Morgane PJ, Mokler DJ. (2006) *The limbic brain: Continuing resolution*. *Neurosci Biobehav*; 30:119-125.
- Mueller DT, Loft A, and Eikelboom R. (1997) *Alternate-day wheel access: effects on feeding, body weight, and running*. *Physiol Behav* 62: 905–908
- Murdoch G.H. Franco R,. (1983) *Polypeptide Hormone Regulation of gene Expression* *Journal of Biological Chemistry* 258: 15329-35,
- Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K. (2000) *Neuronal circuitries involved in thermoregulation*. *Auton Neurosci*. 20;85:18-25.
- Nilaweera KN, Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. (2003) *Precursor-protein convertase 1 gene expression in the mouse hypothalamus: differential regulation by ob gene mutation, energy deficit and administration of leptin, and coexpression with prepro-orexin*. *Neuroscience*.119:713-20.
- Nillni E.A. (1999) *Neuroregulation of ProTRH Biosynthesis and processing* . *Endocrine*, 10:185-99
- Nillni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. (2000) *Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways*. *J Biol Chem*. 17;275:36124-33
- Nisoli E, Carruba MO. *New pharmacological tools for obesity*. *J Endocrinol Invest*. 25:905-14. 2002.
- Orban Z, Bornstein SR, Chrousos GP. (1998) *The interaction between leptin vents fasting-induced suppression of proTRH mRNA and the hypothalamic–pituitary–thyroid axis*. *Horm Metab Res*;30:231–5

- Otake K, Nakamura Y. (2000) *Sites of activation of thyrotropin-releasing hormone on central nervous system revealed by expression of the immediate-early gene c-fos in the rat.* Neuroscience; 95:1167-1177.
- Overton JM, Williams TD. (2004) *Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice.* Physiol Behav 81(5):749-54
- Pacak, K., (2000). *Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary adrenocortical axis.* Physiological Research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca 49, S11–S17.
- Padwal RS, Majumdar SR. (2007) *Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant.* Lancet. 6;369 (9555):71-7.
- Palamara KL, Mogul HR, Peterson SJ, Frishman WH. (2006) *Obesity: new perspectives and pharmacotherapies.* Cardiol Rev. 14:238-58.
- Palkovits, M y Brownstein M. (1988) *Maps and guide to microdissection of the rat brain.* Ed: Elsevier. 1ra edition.
- Perez-Martinez L., Uribe R. M., Sanchez E., Carreon-Rodriguez A., Chavez L., Zacarías M., Joseph-Bravo P., Charli J.L. (1999) *Regulation of TRH biosynthesis in the Paraventricular Nucleus of Rodent Hypothalamus.* Current Topics in Neurochemistry 2:79:87.
- Pezzone, M., Lee, W., Hoffman, G., Rabin, B. (1992) *Induction of c-Fos immunoreactivity in the rat forebrain by conditioned and unconditioned aversive stimuli.* Brain Research 597, 41–50.
- Popovic V, Duntas LH. (2005) *Leptin TRH and ghrelin: influence on energy homeostasis at rest and during exercise.* Horm Metab Res 37:533-7.
- Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. (2000); *Thyroid and lipid metabolism.* Int J Obes Relat Metab Disord 24: S109-12
- Ramos EJ, Meguid MM, Campos AC, Coelho JC. (2005) *Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation.* Nutrition. 21:269-79.
- Richter K., Kashima E., Egger R., Kreil G. (1984) *Biosynthesis of thyrotropin Releasing hormone in the skin of Xenopus Leavis:Partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA.* EMBO journal 3: 617-21.
- Romijn JA, Klein S, Coyle EF, Sidossis LS, Wolfe RR (1993) *Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest.* J Appl Physiol 75:108 –113

- Rondeel JM, de Greef WJ, Hop WC, Rowland DL, (1991) Effect of cold exposure on the hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines. *Neuroendocrinology*. 54:477-81.
- Rosen, J-B., Cain C-J, Weiss SR., Post R.M . (1992) *Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin, and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study*. *Brain Res. Mol.* 15, 247-255.
- Rothwell NJ. (1994) *CNS regulation of thermogenesis*. *Crit Rev Neurobiol*; 8: 1-10
- Sahm UG, Qarawi MA, Olivier GW, Ahmed AR, Branch SK, Moss SH, Pouton CW. (1994) *The melanocortin (MC3) receptor from rat hypothalamus: photoaffinity labelling and binding of alanine-substituted alpha-MSH analogues*. *FEBS Lett.* Aug 15;350:29-32.
- Sarkar S, Lechan RM. (2003) *Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus*. *Endocrinology*. 144:281-91.
- Sattin, A.-E. Pekary and R.-L. Lloyd. (1999) *TRH in therapeutic vs. nontherapeutic seizures: affective and motor functions*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62:575–583.
- Scheen A. Buxton O., Jison M. (1998) *Effects of exercise on Neuroendocrine secretions and glucose regulation at different times of day*. *Am J. Physiol Endocrinol. Metab* 37: E1040-E1049,
- Schmidt, 1977; Schmidt DE. (1977) *Effects of thyrotropine releasing hormone (TRH) on pentobarbital-induced decrease in cholinergic neuronal activity*. *Commun Psychopharmacol* 1:469-73.
- Schwartz MW, Baskin DG, Kaiyala KJ, Woods SC. (1999) *Model for the regulation of energy balance in adiposity by central nervous system*. *Am J. Clin Nutr* 69: 584-596.
- Segerson T. Hoelfler H. (1987) *Localization of Thyrotropin- Releasing Hormone Prohormone Messenger Ribonucleic acid in Rat Brain by in Situ Hybridisation*. *Endocrinology* 121: 98-107.
- Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. (2000) *Regulation of in vivo TSH secretion by leptin*. *Regul Pept.* Aug 25;92(1-3):25-9.

- Sharif NA. (1985) *Diverse roles of thyrotropin releasing hormone in Brain, pituitary and spinal function.* Trends Pharmacol Sci 6:119-22
- Sharp T, Bennett GW, Marsden CA, Tulloch IF. (1984) *A comparison of the locomotor effects induced by centrally injected TRH and TRH analogues.* Regul Pept. 9:305-15.
- Sheppard K.E, Phelps. (1998) *Nuclear Integration of Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B Signaling by CREB-binding Protein and Steroid Receptor Coactivator-1* J. Biol. Chem. 273: 29291-29294.
- Shian LR, Wu MH, Lin MT, Ho LT. (1985) *Hypothalamic involvement in the locomotor stimulant or satiety action of thyrotropin-releasing hormone and amphetamine.* Pharmacology. 30:259-65
- Shibasaki, T., Imaki, T., Hotta, M., Ling, N., Demura, H. (1993) *Psychological stress increases arousal through brain corticotropin-releasing hormone without significant increase in adrenocorticotropin and catecholamine secretion.* Brain Research 618, 71–75.
- Shintani M, Tamura Y, Monden M, Shiomi H. (2005) *Thyrotropin-releasing hormone induced thermogenesis in Syrian hamsters: site of action and receptor subtype.* Brain Res. Mar 28;1039:22-9.
- Silva JE. (2003) *The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications.* Ann Intern Med. 5;139:205-13.
- Silva JE. (2005) *Thyroid hormone and the energetic cost of keeping body temperature.* Biosci Rep. 25:129-48.
- Smith MA, Makino S, Kim SY, Kvetnansky R. (1995) *Stress increases brain-derived neurotropic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary.* Endocrinology. 136:3743-50.
- Speakman JR, Stubbs RJ, Mercer JG. (2002) *Does body mass play a role in the regulation of food intake?* Proc Nutr Soc. 61:473-87.
- Steensberg A, Fisher CP, Keller C. (2003) *IL-6 enhances plasma, and cortisol in humans.* Am J Physiol Endocrinol Metab; 285: E433-7
- Steward CA, Horan TL, Schuhler S, Bennett GW, Ebling FJ. (2003) *Central administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster.* Neuroreport. 15;14:687-91

- Stocca G, Nistri A. (1996) *The neuropeptide thyrotropin-releasing hormone modulates GABAergic synaptic transmission on pyramidal neurones of the rat hippocampal slice*. Peptides. 17:1197-202
- Susuki T, Kohno H, Sakurada T, Tadano T, Kisara K. (1982) *Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats*. Pharmacol Biochem Behav 17:249-53
- Sylvester *et al* 1989, Sylvester P, Forczek S; Ip M, Ip C. (1989) *Exercise training and the differential prolactin response in male and female*. 161:7567-89
- Tache Y, Garrick T, Raybould H. (1990) *Central nervous system action of peptides to influence gastrointestinal motor function*. Gastroenterology. 98:517-28
- Tappy L., Binnert C., Schneiter. (2003) *Energy expenditure, physical activity and body-weight control*. Proceedings of the Nutrition Society 62, 663-666.
- Ter Horst GJ, Luiten PG (1987) *Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat*. Brain Res Bull 18:191–203
- Timofeeva, E., Huang, Q., Richard, D. (2003) *Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system*. Neuroendocrinology 77, 388–405.
- Toni R. (2004) *The neuroendocrine system: organization and homeostatic role* J Endocrinol Invest 27:35-47, Review.
- Tremblay A, Therrien F. (2006) *Physical activity and body functionality: implications for obesity prevention and treatment*. Can J Physiol Pharmacol. 84:149-56.
- Tsigos C, Chrousos GP. (2002) *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress*. J Psychosom Res. 53(4):865-71.
- Uribe R.M Joseph-Bravo, P., Pasten, J.; Ponce, G; Méndez, M; Covarrubias, L y Charli J.L. (1991) *Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats*. Neuroendocrinol 54:493-498,
- Uribe R.M Joseph-Bravo, P., y Charli J.L (1995) *Pups removal enhances thyrotropin-releasing hormone RNAm in the hypothalamic paraventricular nucleus*. Eur J. Endocrinol 133: 354-360
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. (1993) *Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus*. Neuroendocrinology. 58:140-5

- Vaarmann A, Kask A. (2001) *Cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide (CART(62-76))- induced changes in regional monoamine levels in rat brain.* *Neuropeptides.* 35:292-6.
- Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., Rivier, J. (1981) *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin.* *Science* 213, 1394–1397.
- Vandenborne K, Roelens SA, Darras VM, Kuhn ER, Van der Geyten S. (2005) *Cloning and hypothalamic distribution of the chicken thyrotropin-releasing hormone precursor cDNA.* *J Endocrinol.* 186:387-96
- Villa AR, Escobedo MH, Mendez–Sanchez N. (2004) *Estimates and trends of obesity prevalence through mortality rates associated of chronic diseases in Mexico.* *Gac Med Mex;* 140:S21-25.
- Vogel RA, Cooper BR, Bior. arlow TS, Prange AJ, Mueller RA, Breese GR (1979) *Effects or thyrotropin – releasing hormone on locomotor activity, operant performance and ingestive behavior .* *J Pharmacol Exp Ther* 208:161-8.
- Waldrop T, Bauer R, Iwamoro G. (1998) *Microinjection of GABA antagonist into the posterior hypothalamus elicits locomotor activity and a cardiorespiratory activation.* *Brain Res.* 444:84-94
- Wilber JF. (1998) *The thyrotropin-releasing hormone gene 1998: cloning, characterization, and transcriptional regulation in the central nervous system, heart, and testis.* *Thyroid* 8:897-901
- Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. (2004) *Medullary adrenergic neurons contribute to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.* *Brain Res.* 23;1006:1-7.
- Wolfe, R.R., Klein, S., Carraro, F. and Weber, J.-M. *Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise .* *Am. J. Physiol.* 258: E382–E389 (1990)
- Woody CJ, Weber SL, Laubach HE Amini-Alashti P, Ingram-Willey V, (1998) *The effects of chronic exercise on metabolic and reproductive functions in male rats.* *Life Sci.* 62:327-32

- Wu Y.,Koenig R. J., (2000) *Gene Regulation by thyroid Hormone*, Trends in Endocrinology and Metabolism 11:207-11
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. (2003) *Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor*. Nat Neurosci. 6:736-42.
- Yamamura, M., Kinoshita, K., Nakagawa, H., Ishida, R. (1991) *Pharmacological study of TA-0901, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog (II): involvement of the DA system in the locomotor stimulation action of TA-0901*. Jpn. J. Pharmacol. 55, 57±68.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. (2001) *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity*. Nat Med; 7: 941-6.
- Yanagita S, Amemiya S, Suzuki S, Kita I. (2007) *Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats*. Life Sciences 80 356–363
- Yang H, Tache Y, Ohning G, Go VL (2002) *Activation of raphe pallidus neurons increases insulin through medullary thyrotropin-releasing hormone (TRH)-vagal pathways*. Pancreas 25: 301-307
- Yang H, Yuan P, Wu Vm Tache Y. (1999) *Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the caudal raphe nuclei in rat*. Endocrinology 140:43-49,
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature 372, 425–432.
- Zigman JM, Elmquist JK. (2006) *In search of an effective obesity treatment: a shot in the dark or a shot in the arm?* Proc Natl Acad Sci U S A. 29;103:12961-2.
- Zoeller RT, Kabeer N, Albers HE. (1990) *Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones*. Endocrinology.127:2955-62.
- Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA, Chang J, Otsuji J, Inoue K, Meijler MM, Janda KD. (2006) *Vaccination against weight gain*. Proc Natl Acad Sci USA. 29;103:13226-31.