



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“EFECTO EN LA ANOREXIA POR
DESHIDRATACIÓN EN LA EXPRESIÓN
DE LOS GENES DE TRH, CRH Y SUS
RECEPTORES EN EL SISTEMA LÍMBICO
DE RATA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

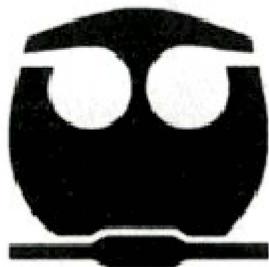
P R E S E N T A :

**ELIZABETH LORRAINE
JAIMES HOY**

Tutor: DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO

MÉXICO, D. F.

ENERO 2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

EFFECTO EN LA ANOREXIA POR DESHIDRATACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE TRH, CRH Y SUS RECEPTORES EN EL SISTEMA LÍMBICO DE RATA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Patricia de Gortari Gallardo en el laboratorio de Neurofisiología Molecular, en el Departamento de Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM".

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Patricia de Gortari Gallardo	Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM"
Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Dra. Patricia Joseph-Bravo	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración de la Dra. Patricia Joseph-Bravo, del Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de radioinmunoensayo y ELISA .

Se reconoce la asesoría técnica del Q.F.B. Miguel Cisneros en los experimentos de radioinmunoensayo y ELISA.

Se reconoce el apoyo técnico de Isabel Amaya, del Lab. de Neurofisiología Molecular, del Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM".

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 31 de enero del 2006.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Jean-Louis Charli Casalonga	Instituto de Biotecnología, UNAM
Vocal	Dr. Carlos Cruz Fuentes	Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM"
Suplente	Dra. Lourde Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Iván Velasco Velásquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

RESÚMEN

La anorexia nervosa es un complejo trastorno alimenticio asociado a una serie de alteraciones neuroendócrinas. El eje hipotálamo-hipófisis adrenal y tiroideo (HHT) se encuentran alterados.

El eje HHT está regulado por la hormona liberadora de tirotropina (TRH) sintetizada en el Núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). El TRH se sintetiza en diversas regiones del cerebro donde ejerce una función neuromoduladora, por ejemplo puede actuar como un neuropéptido anorexigénico. Su metabolismo es regulado por el estado de nutrición; en el ayuno, el eje tiroideo se inhibe: disminuye la síntesis del TRH en el NPV y su liberación, esto lleva a una disminución de la concentración sérica de tirotropina (TSH) y de las hormonas tiroideas; paradójicamente la retroalimentación negativa está bloqueada. El objetivo del estudio fue definir la participación del TRH en el control central de la conducta alimentaria. Se usaron ratas Wistar hembras adultas. El experimento duró 7 días. Los grupos que se utilizaron para el estudio fueron: Control: consumo libre de alimento y agua; anorexia por deshidratación (AN): consumo libre de alimento y solución salina al 2.5% como bebida (restricción voluntaria del consumo de alimento); restricción Alimentaria forzada (RA): consumo libre de agua e isocalórico al grupo AN. Las regiones del cerebro estudiadas fueron: NPV, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo, y corteza insular, elegidas por su participación en la conducta alimentaria. Se semicuantificó el RNAm de pro-TRH, TRH-R1, TRH-R2, pro-CRH, CRH-R2 y GR por RT-PCR. En suero se midió la concentración de leptina por ELISA; y corticosterona, hormonas tiroideas (T3, T4) y TSH por radioinmunoensayo. El grupo AN y RA disminuyeron su consumo de alimento un 83% y perdieron un 20% y un 13% de su peso (respectivamente) vs el control (100%). En ambos grupos disminuyó la concentración sérica de leptina y aumentó la de corticosterona. En la RA, el eje tiroideo se encontró inhibido: la expresión de proTRH y de TRH-R1 en el NPV disminuyó; TSH, T3 y T4 disminuyeron. En la AN la expresión de proTRH no cambió. Pero la concentración sérica de TSH y T4 aumentaron, sugiriendo una activación del eje tiroideo. La expresión de proCRH en el NPV en la RA y la AN disminuyó, y se encontró una respuesta diferencial en la expresión de CRH-R2 entre la RA y la AN. Además, en la AN disminuyó la expresión de TRH-R1 y de la PPII en la adenohipófisis, las cuales son reguladas positivamente por la acción de TRH. En la amígdala se encontraron cambios significativos en la vía TRHérgica y CRHérgica entre la RA y la AN. En la RA disminuyó la expresión de TRH-R1, proCRH y aumentó la de CRH-R2 y GR; mientras que en la AN disminuyó la expresión de proTRH y aumentó la de CRH-R2. En el núcleo accumbens aumentó la expresión de proTRH y disminuyó la expresión de CRH tanto en la RA y la AN, mientras que la expresión de TRH-R1 aumentó solamente en la AN. En el hipocampo aumentó la expresión de proTRH y disminuyó la de TRH-R1 en la RA. En la corteza frontal disminuyó la expresión de proTRH en la AN y disminuyó la expresión de TRH-R1 en la RA.

A pesar de que se presentaron los mismos cambios metabólicos en la RA y la AN, el eje HHT en la AN no se adaptó a la restricción calórica como en el grupo de la RA. Los cambios en el metabolismo del TRH en el Sistema Límbico sugieren la participación de este neuropéptido en la anorexia por deshidratación.

INDICE

I.	Introducción	1
	El hipotálamo regula la conducta alimentaria	2
	Regulación hormonal periférica de la conducta alimentaria	3
	Alteraciones neuroendócrinas en la Anorexia Nervosa	5
	El modelo de la anorexia inducida por deshidratación	7
	El sistema límbico y su participación en la regulación de la conducta alimentaria	9
	Aspectos generales de la hormona liberadora de tirotropina (TRH)	11
	Estructura del gen de la hormona liberadora de tirotropina y su biosíntesis	13
	Receptores de TRH	14
	Inactivación de TRH	15
	Regulación del metabolismo del TRH en el eje neuroendocrino	16
	El TRH como neuromodulador	20
	Regulación de las neuronas TRHérgicas en diferentes modelos de restricción alimentaria y anorexia	21
	Aspectos generales de la hormona liberadora de corticotropina (CRH)	22
II.	Justificación	25
III.	Hipótesis	28
IV.	Objetivos	28
V.	Materiales y Métodos	29
VI.	Resultados	31
	Ingesta de alimento y líquido	31
	Peso	31
	Proteína sérica	33
	Leptina	33
	Corticosterona	34
	Cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo	36
	Cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	40
	Cambios extrahipotálamicos en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico	42

VII.	Discusión	52
	Cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo	53
	Cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	58
	Cambios en estructuras extrahipotalámicas	61
VIII.	Conclusiones y Perspectivas	68
IX.	Referencias	69
X.	Anexos	95

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Péptidos hipotalámicos involucrados en el control de la ingesta alimentaria	3
Figura 2.	Regulación hormonal periférica de la conducta alimentaria	4
Figura 3.	El TRH del NPV regula el eje hipotálamo-hipófisis tiroides	12
Figura 4.	Regulación del eje tiroideo por la leptina a través de su acción directa o indirecta sobre las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo	18
Figura 5.	Consumo de alimento	32
Figura 6.	Consumo de agua	32
Figura 7.	Cambio en el peso corporal	33
Figura 8.	Proteína sérica	34
Figura 9.	Leptina sérica	35
Figura 10.	Corticosterona sérica	35
Figura 11.	Cambios del metabolismo TRHérgico en el NPV	38
Figura 12.	Cambios en el metabolismo TRHérgico en la adenohipófisis	38
Figura 13.	TSH sérico	39
Figura 14.	Hormonas tiroideas séricas	39
Figura 15.	Cambios en la vía CRHérgica en el NPV	41
Figura 16.	Expresión del receptor a glucocorticoides en la adenohipófisis	41
Figura 17.	Cambios en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en la amígdala	43
Figura 18.	Cambios en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en el n. accumbens	45
Figura 19.	Cambios en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en el hipocampo	47
Figura 20.	Cambios en el metabolismo TRHérgico y en los niveles del RNAm de GR en la corteza frontal	49
Figura 21.	Cambios en el metabolismo TRHérgico y en los niveles del RNAm de GR en la corteza insular	51

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	hormona α estimulante del melanocito
Ab	anticuerpo
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
AgRP	péptido relacionado al agouti
CART	transcrito regulado por cocaína y amfetamina
CRH	hormona liberadora de corticotropina
CRH-R1	receptor tipo 1 para la hormona liberadora de corticotropina
CRH-R2	receptor tipo 2 para la hormona liberadora de corticotropina
GC	glucocorticoides
GH	hormona del crecimiento
GR	receptor a glucocorticoides
HHA	hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHT	hipotálamo-hipófisis-tiroides
i.cv.	intracerebroventricular
i.p.	intraperitoneal
MCH	hormona concentradora de melanina
MC4R	receptor 4 de la melanocortina
MR	receptor a mineralocorticoides
NPY	neuropéptido Y
NPV	núcleo paraventricular del hipotálamo
POMC	proopiomelanocortina
PPII	piroglutamil peptidasa II
PRL	prolactina
RA	restricción alimentaria
ANX	anorexia inducida por deshidratación
SNC	sistema nervioso central
T3	triyodotironina
T4	tiroxina
TRH	hormona liberadora de tirotropina
TRH-R1	receptor tipo 1 de la hormona liberadora de tirotropina
TRH-R2	receptor tipo 2 de la hormona liberadora de tirotropina
TSH	tirotropina

I. INTRODUCCIÓN

La motivación por ingerir algún alimento como respuesta a la sensación de hambre, está estrictamente regulada en los mamíferos por señales hormonales y neuronales (Leibowitz y Wortley, 2004). A lo largo del tiempo, la cantidad de energía ingerida puede verse influenciada por varios factores, y sin embargo, las reservas energéticas almacenadas en forma de tejido adiposo se mantienen relativamente constantes (Jequier y Tappy, 1999). Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo homeostático que compensa las diferencias en el balance energético.

Los factores ambientales y el tipo o los tipos de nutrimentos consumidos (carbohidratos, grasas, proteínas) (Konturek et al., 2004) pueden alterar la ingesta de los alimentos y el gasto energético. Por ejemplo, las señales fisiológicas que incluyen la información neuronal relacionada a ciclos circádicos, estacionales, señales metabólicas que reflejan la concentración de los diferentes sustratos utilizados por el cerebro y otros órganos; señales gastrointestinales generadas por la distensión gástrica, y la liberación de péptidos del tracto gastrointestinal en respuesta a los nutrimentos ingeridos (Konturek et al., 2004; Woods, 2004; Adam y Mercer, 2004). Los factores emocionales y la palatabilidad de los alimentos también pueden ejercer efectos transitorios o duraderos en la cantidad de alimento (Konturek et al., 2004; Erlanson-Albertsson, 2005).

El hipotálamo regula la conducta alimentaria

En el hipotálamo se integra la información de las señales centrales y periféricas para regular la homeostasis energética (Berthoud, 2002). Los péptidos orexigénicos y anorexigénicos (Fig. 1) que constituyen una gran parte del circuito neuronal que regula la conducta alimentaria y el peso corporal, son sintetizados por las neuronas localizadas en los diferentes núcleos hipotalámicos (Leibowitz y Wortley, 2004; Jaimes y cols., 2005).

En la parte media del núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) se encuentran numerosas neuronas que sintetizan al neuropéptido Y (NPY) y al péptido relacionado al agouti (AgRP), los cuales estimulan la ingesta de alimento; mientras que en la parte lateral del ARC se encuentran neuronas que sintetizan el transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART) y la pro-opiomelanocortina (POMC) del cual se deriva otro péptido, la hormona α estimulante del melanocito (α -MSH) los cuales inhiben la ingesta de alimento (Cone y cols., 2001).

El hipotálamo lateral, conocido como el centro del hambre, está formado por neuronas que estimulan la ingesta de alimento, estas neuronas sintetizan las orexinas/hipocretinas (Sakurai y cols. 1998) y la hormona concentradora de melanina (MCH) (Bittencourt y cols., 1992).

En el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMN) no se encuentran muchas neuronas que sintetizen neuropéptidos, pero se ha demostrado que existen neuronas glucoreceptivas que expresan receptores a la leptina.

El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) está constituido por células magnocelulares y parvocelulares; las neuronas magnocelulares sintetizan vasopresina y oxitocina, y sus axones se proyectan a la hipófisis posterior. Las neuronas parvocelulares del NPV sintetizan péptidos anorexigénicos como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), y sus axones se proyectan a la eminencia media, los péptidos son secretados a la circulación hipotálamo-hipófisis portal para llegar a la hipófisis anterior (Swanson y Sawchenko, 1983). Las neuronas parvocelulares del NPV también están constituidas por neuronas autonómicas con axones que se proyectan a neuronas pregangliónicas simpáticas en la médula espinal (Swanson y Sawchenko, 1983).

Estimulan la ingesta alimentaria	Inhiben la ingesta alimentaria
Neuropéptido Y (NPY)	Hormona liberadora de Tirotrópina (TRH)
Orexina/hipocretina	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
Péptido relacionado al agouti (AgRP)	Leptina
Hormona concentradora de melanina (MCH)	Hormona α estimulante del melanocito (α -MSH)
Galanina	Pro-opio-melanocortina (POMC)
Glutamato	Péptido similar al glucagón 1 (GLP-1)
Ácido γ -aminobutírico (GABA)	Transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART)

Figura 1. Péptidos hipotalámicos involucrados en el control de la ingesta alimentaria. Los péptidos del lado izquierdo del recuadro son orexigénicos, es decir, estimulan la ingesta de alimento. Los péptidos del lado derecho del recuadro son anorexigénicos, es decir, inhiben la ingesta de alimento.

Regulación hormonal periférica de la conducta alimentaria

Las señales periféricas modulan las vías hipotalámicas neuronales que participan en el control de la conducta alimentaria, a través de la regulación de la expresión de los péptidos orexigénicos y anorexigénicos (Fig. 2). Estas señales periféricas pueden dividirse en dos tipos:

- 1) las señales gastrointestinales como la grelina, la cual ejerce un efecto a corto plazo. La grelina es un factor orexigénico sintetizado principalmente en el estómago. En humanos este péptido es regulado por la ingesta de alimento, su concentración sérica baja después el consumo de alimento (Tschop y cols., 2000) y aumenta en periodos de ayuno (Tschop y cols., 2001). En las ratas, la administración central o periférica de grelina aumenta la ingesta de alimento y el peso corporal, mientras que disminuye la lipólisis (Tschop y cols., 2000).
La grelina ejerce sus efectos orexigénicos a través de la regulación positiva de la expresión de NPY y AgRP en el ARC (Wang y cols., 2002).
- 2) las señales adipostáticas como la leptina y la insulina, las cuales ejercen un efecto a largo plazo. La leptina sintetizada en el tejido adiposo y la insulina sintetizada en el páncreas, son dos hormonas que participan en la homeostasis energética. La restricción calórica induce una

disminución de la concentración sérica de leptina, este efecto puede revertirse con el consumo de alimento o con la inyección de insulina (Saladin y cols., 1995). La circulación de la leptina refleja los depósitos de energía (grasa) y la disponibilidad de nutrientes.

La leptina inhibe las neuronas que expresan los péptidos orexigénicos NPY/AgRP y activa las neuronas que expresan los péptidos anorexigénicos POMC/CART en el ARC. Por lo tanto cuando disminuye la concentración sérica de la leptina como en el caso del ayuno, las neuronas orexigénicas se activan y las anorexigénicas se inhiben (Jaimes y cols., 2005).

La concentración sérica de la insulina también está positivamente correlacionada con los depósitos de grasa, y después de la ingesta de alimento esta aumenta rápidamente. Cuando la insulina entra al cerebro actúa como una señal anorexigénica, disminuyendo la ingesta de alimento y el peso corporal, este efecto es a través de la regulación de la expresión del NPY y de POMC (Wynne y cols., 2005).

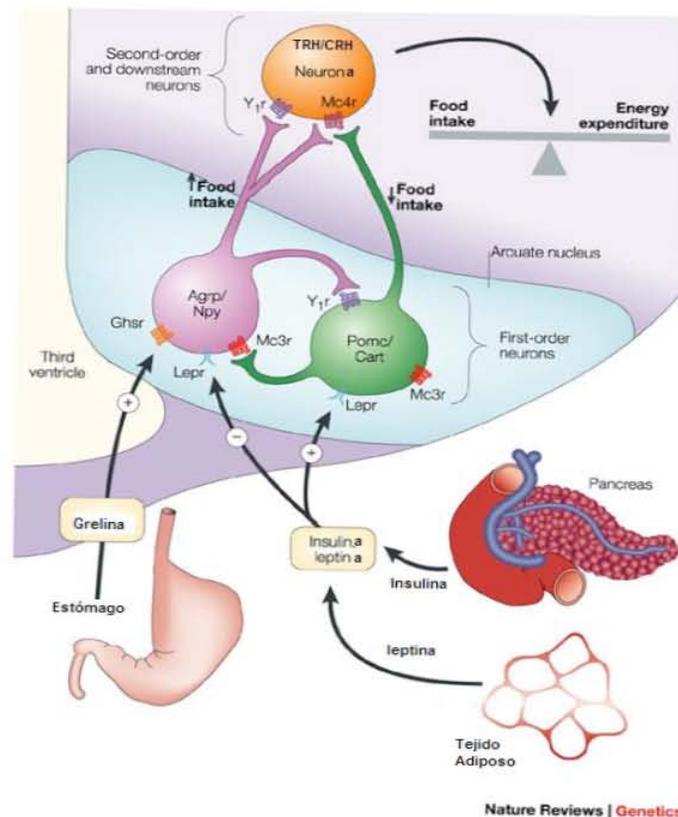


Figura 2. Regulación hormonal periférica de la conducta alimentaria

ALTERACIONES NEUROENDÓCRINAS EN LA ANOREXIA NERVOSA

La anorexia nervosa es un complejo trastorno alimentario que afecta principalmente adolescentes y mujeres jóvenes. Este trastorno se caracteriza por alteraciones de la conducta alimentaria, es decir, disminución voluntaria del consumo de alimento, rechazo a mantener el peso corporal mínimo normal, miedo intenso a ganar peso y alteración en la percepción de la imagen corporal. La prevalencia de esta enfermedad varía de 0.5% a 1.5%. Algunos estudios realizados en México han reportado que el 60% de las mujeres adolescentes que asisten a escuelas privadas llevan a cabo dietas para bajar de peso, y entre el 2.5% y el 12% utilizan el vómito autoinducido, laxantes o diuréticos para este mismo fin (Unikel y Villatoro, 2000). Otro estudio realizado con estudiantes de escuelas públicas del Distrito Federal reporta que un 5.4% de mujeres entre los 13 y 15 años de edad y un 16.1% entre los 16 y 18 años de edad presentan un riesgo a desarrollar una patología alimentaria (Unikel et al., 2002).

Se sabe poco sobre la fisiopatología de este trastorno. Existe evidencia que sugiere la posibilidad de que uno o más neuropéptidos en el cerebro contribuyan a la sintomatología de la AN, como alteraciones del estado de ánimo (ansiedad, depresión) y alteraciones de la conducta alimentaria (resistencia a ingerir alimentos) (Jimerson y Wolfe, 2004; Fetissov et al., 2005). Estudios previos en animales y humanos han reportado que existen neuropéptidos en el cerebro que modulan ciertas funciones homeostáticas como la ingesta de alimento, la regulación del peso corporal, las actividades neuroendócrinas, así como estados de ánimo y cognición (Berthoud, 2002; Leibowitz y Wortley, 2004).

Hormona liberadora de corticotropina (CRH)

Pacientes anoréxicos con bajo peso presentan una elevada secreción de cortisol (Douyon y Schteingart, 2002) lo que refleja una activación del eje HHA. Existe controversia sobre la fisiopatología del hipercortisolismo en la anorexia nervosa. Estudios previos han sugerido que esto se debe a una hipersecreción endógena de CRH (Gold et al., 1986). De hecho, varios estudios han reportado una elevada concentración de CRH en el líquido cerebroespinal de anoréxicos con bajo peso (Kaye, 1996;

Hotta et al., 1986), y la elevada concentración de CRH se normaliza después de que el paciente gana peso; esto está asociado con una relativa normalización del funcionamiento del eje adrenal.

La administración i.c.v. de CRH a animales produce varios cambios fisiológicos y conductuales asociados a la AN, como por ejemplo, disminución de la ingesta de alimentos, pérdida de peso, disminución de la actividad sexual e hiperactividad (Schwartz et al., 1995). Además, se ha propuesto que la hipersecreción hipotalámica de CRH está relacionada a la depresión en los anoréxicos (Kaye, 1996). Hasta 75% de los pacientes con depresión, presentan un aumento de la concentración plasmática de cortisol, aumento de la excreción urinaria de cortisol y resistencia a la retroalimentación negativa de los glucocorticoides (Orth, 1992).

Neuropéptido Y (NPY)

El NPY está formado de 36 aa y pertenece a la familia de polipéptidos pancreáticos, presentes en el SNC y en el Sistema Nervioso Periférico (Leibowitz y Wortley, 2004). Kaye y cols. (1990), reportan que los anoréxicos con bajo peso tienen significativamente elevada la concentración del NPY en el líquido cerebroespinal comparado a sujetos sanos. La elevada concentración del NPY en el líquido cerebroespinal regresa a valores normales después de la recuperación de las pacientes; sin embargo, las pacientes anoréxicas con amenorrea continúan presentando concentraciones altas del NPY en el líquido cerebroespinal. Sin embargo, la concentración sérica de NPY en mujeres con anorexia está disminuida (Baranowska et al., 2003).

Leptina

La leptina es una proteína sintetizada y secretada por las células del tejido adiposo. La principal función fisiológica de esta hormona es el de proveer información sobre los depósitos de energía y el balance energético a los centros del cerebro que regulan la ingesta alimentaria, el gasto energético y las funciones neuroendócrinas (Hukshorn y Saris, 2004; Arch, 2005).

En humanos, aumenta la concentración sérica de la leptina en proporción a la masa grasa y al tamaño de los adipocitos, y en roedores aumenta el RNAm de la leptina en el tejido adiposo en proporción a la masa grasa (Sivitz et al., 1997; Fried, 2000; Chan y Mantzoros, 2005).

En la desnutrición y en anoréxicos con bajo peso, disminuye significativamente la concentración plasmática de leptina (Eckert et al., 1998). Mantzoros y cols. (Mantzoros et al., 1997), reportaron que en la AN disminuye significativamente la concentración de leptina en el líquido cerebroespinal con respecto a los controles, y durante la realimentación de estos pacientes, la concentración de leptina en el líquido cerebroespinal alcanza los valores normales antes de la completa recuperación de peso de los pacientes.

EL MODELO DE LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN

La anorexia inducida por deshidratación es un paradigma útil para estudiar la anorexia en ratas, cuando se les proporciona una solución salina al 2.5% en lugar de su agua para que consuman de manera voluntaria, los animales disminuyen su consumo de alimento voluntariamente (Watts, 1998). Todavía no se conocen los mecanismos neuronales que participan en la reducción voluntaria del consumo de alimento. Watts y cols. (1999), investigaron los cambios hormonales y neuropeptidérgicos de la anorexia inducida por deshidratación en ratas adultas. Su experimento tuvo una duración de cinco días.

Las ratas con anorexia inducida por deshidratación y las ratas con restricción alimentaria forzada (pareadas a las ratas con anorexia) perdieron la misma cantidad de peso corporal y disminuyeron su consumo de alimento; además presentaron las mismas características endócrinas y neuropeptidérgicas que normalmente se observa en la restricción alimentaria: aumento en la concentración del RNAm de NPY, disminución de la concentración del RNAm de pro-opio-melanocortina y de neurotensina en el ARC; aumento de la concentración sérica de corticosterona y disminución de la concentración sérica de leptina e insulina.

Adicionalmente, en nuestro laboratorio hemos encontrado en estudios previos que el contenido de TRH en el NPV disminuye en la restricción alimentaria pero no en la anorexia inducida por deshidratación durante un periodo de 7 días, mientras que el contenido de TRH en la eminencia media se encuentra aumentada en la restricción alimentaria y disminuida en la anorexia. Estos resultados sugieren que en la restricción alimentaria la liberación del TRH está disminuida, mientras que en la anorexia está aumentada (Jaimes, 2003).

A pesar de los cambios neuroendócrinos mencionados anteriormente, las ratas con anorexia no consumen alimento; esto sugiere que las neuronas del ARC sensibles a leptina e insulina, que estimulan la ingesta de alimentos pudieran estar inhibidas o que existen otros mecanismos neuronales que se activan durante la anorexia para inhibir la ingesta de alimento.

Estos resultados apoyan al modelo de la anorexia inducida por deshidratación para estudiar los mecanismos neuronales que participan en condiciones donde el animal parece no tener motivación por comer, en contraste con aquellos mecanismos relacionados con el hambre, como en la restricción alimentaria forzada.

EL SISTEMA LÍMBICO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA CONDUCTA

ALIMENTARIA

La amígdala está involucrada en el balance energético, recibe información metabólica e información sobre el control autonómico (Herman y Cullinan, 1997). Por ejemplo, lesiones bilaterales en la amígdala llevan a un aumento de peso en las ratas (Bamshad et al., 1998; Bartness y Bamshad, 1998; King et al., 1996).

Además, participa en las respuestas al estrés, dando un significado emocional y motivacional a los estímulos sensoriales (Ledoux, 2000). Estudios de resonancia magnética han reportado que la actividad neuronal de la amígdala aumenta en diversos estados afectivos como el miedo y la ansiedad (Furmark et al., 1997; Critchley et al., 2002), y en conductas relacionadas a la búsqueda y consumo de alimento (Fukuda y Ono, 1993). Por ejemplo, la actividad neuronal de esta región cerebral aumenta en respuesta a estímulos visuales u olfativos relacionados al alimento, y en respuesta a sabores agradables y/o desagradables en humanos (Gottfried et al., 2003).

Además, estudios de resonancia magnética en mujeres con anorexia se ha demostrado una activación de las neuronas de la amígdala (Berthoud, 2002).

El núcleo accumbens participa en la regulación de la conducta alimentaria (Berridge y Robinson, 1998), lo que está apoyado por estudios farmacológicos, la inyección i.c.v. de agonistas a opioides, agonistas de GABA y antagonistas de glutamato en el núcleo accumbens aumenta la ingesta de alimentos ricos en azúcares y/o grasas (Zhang y Kelly, 2002; Reynolds y Berridge, 2001), y además la ingesta de una solución con sacarosa al 10% aumenta la tasa de disparo de las neuronas en esta región cerebral (Taha y Howard, 2005).

Actualmente todavía no se conocen bien los mecanismos a través de los cuales participa el núcleo accumbens en la conducta alimentaria. El núcleo accumbens tiene conexiones recíprocas con el hipotálamo lateral, el cual participa en la conducta alimentaria (Stratford y Kelley, 1999). La ingesta de alimentos inducida por la inyección de agonistas a GABA en el núcleo accumbens puede bloquearse con la inyección de antagonistas a GABA en el hipotálamo lateral (Stratford y Kelley, 1999). Además, el núcleo accumbens tiene una gran expresión del receptor a MCH (Saito et al., 2001), sugiriendo que

las neuronas MCHérgicas del hipotálamo lateral (sitio donde se sintetiza el MCH) juega un papel importante en esta relación con el núcleo accumbens y su participación en la conducta alimentaria.

El hipocampo está involucrado en aspectos de memoria y aprendizaje relacionado a la conducta alimentaria. Sin embargo, algunos estudios han propuesto una función adicional y específica del hipocampo en la conducta alimentaria. Ratas con lesiones neurotóxicas en el hipocampo ingieren una menor cantidad de alimento, pero con mayor frecuencia. Adicionalmente, el hipocampo es uno de los principales blancos neuronales de la acción de los glucocorticoides; contiene una alta expresión de receptores a mineralocorticoides y a glucocorticoides, donde éste último media varias funciones de aprendizaje y memoria (Bodnoff y cols., 1995).

Las neuronas de la corteza frontal responden a situaciones de estrés, a sabores agradables y/o desagradables, y a estados de hambre o saciedad (Critchey y Rolls 1996; Rolls 200; O'Doherty et al., 2000). Además, se ha observado que déficits cognitivos de la corteza frontal y alteraciones del eje HHA están involucrados en desórdenes neuropsiquiátricos relacionados con el estrés como la depresión y la anorexia (Dolan y cols., 1994; Drevets y cols., 1997). La corteza prefrontal, junto con el hipotálamo y el hipocampo, participa en el sistema de retroalimentación negativa del eje adrenal. Por ejemplo, la inyección de GC en la corteza prefrontal disminuye la concentración sérica de corticosterona (Dioriorio y cols., 1993).

La corteza insular participa en la memoria de aspectos sensoriales relacionados al alimento (Cardinal et al., 2002). Además, sus neuronas responden a estímulos gustatorios en la lengua de la rata y se activan en respuesta a sabores agradables (ej. sabores dulces como la glucosa) o desagradables (ej. sabores salados) (Ogawa et al., 1992; Hanamori et al., 1998; Berma et al., 1998).

ASPECTOS GENERALES DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)

La hormona liberadora de Tirotropina regula el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo

La hormona liberadora de tirotropina (TRH, pGlu-His-ProNH₂) es un tripéptido con funciones tanto endócrinas como neuronales; fue el primer factor hipotalámico de liberación purificado y caracterizado por Boler y cols. (1969) y Burgus y cols. (1969). Esta neurohormona peptídica es uno de los factores hipotalámicos que se encarga de controlar la función del eje hipotálamo-hipófisis-tiroidea (HHT) (Bowers et al., 1971) (Fig.3). Se sintetiza en el NPV del hipotálamo y es transportada a través de los axones acumulándose en la porción terminal de los nervios en la eminencia media, de donde es liberada. Así, el TRH alcanza el lóbulo anterior de la hipófisis a través de los vasos del sistema hipotálamo-hipófisis portal. En la adenohipófisis, el TRH se une a receptores específicos en las células tirótropas y lactótropas, estimulando la síntesis y liberación de tirotropina (TSH) y prolactina (PRL), respectivamente (Bowers et al., 1971). La TSH a su vez, estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T₃ y T₄), las cuáles, por retroalimentación negativa regulan la síntesis de la TRH y la TSH en el NPV y en la adenohipófisis, respectivamente (Yen, 2001).

El TRH del NPV del hipotálamo (Griffiths, 1985) regula el metabolismo energético y la temperatura corporal. Por ejemplo, una pérdida de peso del 10% provoca una adaptación metabólica del eje HHT (Leibel y Rosenbaum, 1995), probablemente por la disminución de la concentración del RNAm de TRH en el NPV (Blake et al., 1991; van Haasteren 1995) y esto disminuye la actividad del eje provocando una menor concentración de hormonas tiroideas en sangre, lo cual genera la disminución de la termogénesis y el ahorro de las reservas energéticas.

El TRH también tiene un papel importante en la integración de una serie de respuestas termogénicas al frío (Arancibia y cols., 1996). La exposición al frío induce un aumento en los niveles del RNAm de proTRH y su liberación en el NPV (Uribe y cols., 1993). Estos cambios llevan a un aumento de las hormonas tiroideas las cuales al interactuar con las proteínas desacopladoras en el tejido adiposo pardo aumenta la producción de calor (Carvalho y cols., 1991). La inyección central de TRH eleva la

temperatura corporal (Boschi y Rips, 1981), y antagoniza los efectos hipotérmicos de una serie de agentes como el etanol, los barbitúricos y la β -endorfina (Horita, 1998).

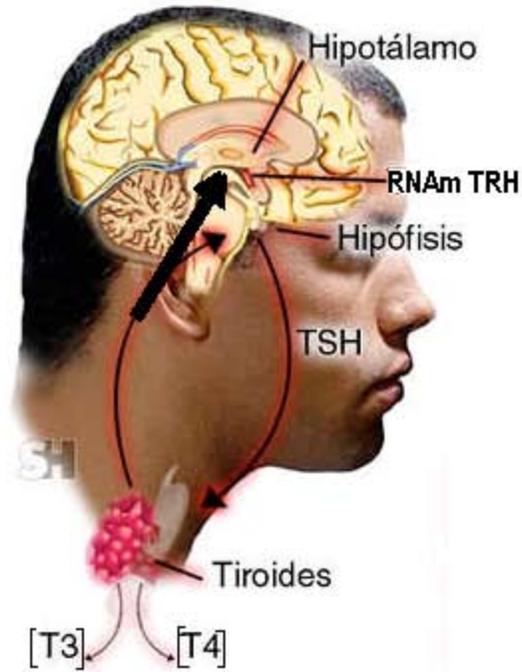


Fig.3 El TRH del NPV regula el control del eje hipotálamo-hipófisis tiroides. El TRH estimula la síntesis y liberación de TSH en la adenohipófisis, esta a su vez estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T3 y T4). Las hormonas tiroideas por retroalimentación negativa inhiben la síntesis de TSH en la adenohipófisis y la síntesis de TRH en el NPV.

Estructura del gen de la hormona liberadora de tirotropina y su biosíntesis

El gen que codifica para el pro-TRH ha sido clonado tanto en rata (Lee et al., 1988) como en humanos (Yamada et al., 1990). La unidad de transcripción consta de tres exones separados por dos intrones. El exón 1 codifica la región 5' no traducida; el exón 2, para el péptido señal y para una pequeña porción del péptido amino terminal; mientras que la mayor parte del propéptido de TRH (proTRH) se encuentra codificado en el tercer exón (Joseph-Bravo et al., 1998).

La región 5' contiene la región promotora que codifica para varios elementos reguladores:

1. Dos unidades sencillas que unen el receptor de la hormona tiroidea (TR) en su forma monomérica y una tercera que une tanto TR homodimérica como heterodimérica con proteínas auxiliares de TR (Hollenberg et al., 1995).
2. Un sitio consenso para la unión de los receptores de glucocorticoides (GR) (Joseph-Bravo et al., 1998).
3. Dos elementos de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (CREs) (Joseph-Bravo et al., 1998).

El TRH es sintetizado a partir del procesamiento postraducciona l de un precursor peptídico de mayor tamaño llamado prepro-TRH. El aislamiento del DNA complementario (cDNA) que codifica la secuencia de prepro-TRH en *Xenopus laevis* (Richter et al., 1984), en rata (Lechan et al., 1986a) y en humano (Yamada et al., 1990) ha mostrado que el TRH proviene de una proteína de gran tamaño que contiene varias copias de la secuencia progenitora para este péptido, 5 copias en rata (Lechan et al., 1986a) y 6 copias en humano (Joseph-Bravo et al., 1998).

El prepropéptido de TRH de rata es un polipéptido de 29 kilodaltons (kDa) compuesto de 255 aa. Este precursor tiene un extremo amino-terminal (N-terminal) formado por una secuencia líder de 25 aa, 5 copias de la secuencia progenitora de TRH (Gln-His-Pro-Gly) flanqueada por pares de aa básicos (Lys-Arg o Arg-Arg), 4 péptidos intermedios entre las secuencias del TRH, un péptido N-terminal

(prepro-TRH₂₀₋₂₅-R-R-prepro-TRH₅₃₋₇₄) y un péptido C-terminal (prepro-TRH₁₅₄ o ₁₆₀₋₂₅₅) (Lechan et al., 1986a,b; Sevarino et al., 1989).

La biosíntesis del TRH y otros derivados peptídicos de pro-TRH comienza con la traducción ribosomal dirigida por el RNAm, seguido por la proteólisis postraducciona de un precursor de mayor tamaño, proTRH. La hidrólisis del precursor para generar TRH biológicamente activo ocurre en los residuos de los pares de aa básicos por la acción de la prohormona convertasa 1 (PC1) y prohormona convertasa 2 (PC2) (Nillni et al., 1995; Schaner et al., 1997), seguido por la acción de la carboxipeptidasa E (CPE) para remover los residuos básicos (Nillni et al., 1997). Posteriormente el tripéptido Gln-His-Pro-Gly es amidado por la acción de la enzima glicina α -amidante monooxigenasa (PAM), la cual usa la glicina C-terminal de como el donador de la amida, mientras que el residuo Gln es ciclizado a pGlu para formar TRH por la glutaminil ciclasa (Fischer y Spiess, 1987; Nillni, 1999).

Receptores de TRH

La acción de TRH es mediada vía sus receptores (Gershengorn y Osman, 1996; Sun et al., 2003). Existen dos tipos de receptores para TRH, el receptor tipo 1 (TRH-R1) y el receptor tipo 2 (TRH-R2). Los receptores de TRH pertenecen a la familia de receptores constituidos por 7 dominios transmembranales acoplados a proteínas G. El TRH-R1 y 2 en la rata, presentan una afinidad similar y traducción de su actividad a través de la vía del fosfoinositidil-calcio. Sin embargo, estos dos receptores presentan una diferente distribución anatómica (Sun y Gershengorn, 2002; Sun et al., 2003).

El TRH-R1, se encuentra en la adenohipófisis y es el responsable de la función neuroendócrina del péptido (Nillni y Sevarino et al., 1999). En el cerebro, el RNAm predomina en regiones límbicas asociadas con la regulación del estado de ánimo como el giro dentado del hipocampo, la amígdala, el núcleo accumbens y la corteza piriforme (Calzá et al., 1992).

Por otro lado, el RNAm del TRH-R2 está localizado en regiones del cerebro como el hipotálamo, el hipocampo, la corteza, la amígdala y el tálamo (Mitsuma et al., 1999), áreas que participan en procesos como la atención y el aprendizaje, el despertar y el sueño. Además, se encuentra en regiones que procesan información sensorial (Hinkle et al., 2002). También se ha observado que este receptor podría estar involucrado en funciones o procesos como la nocicepción y en el control motor (O'Dowd et al., 2000).

Inactivación de TRH

El TRH es degradado por una ectoenzima específica, la piroglutamil peptidasa II (PPII) la cual tiene su mayor actividad en el SNC (Bauer et al., 1990; Lin y Wilk, 1998), pero también se encuentra en la adenohipófisis y en otros tejidos como el hígado y los riñones (Nillni, 1999).

La PPII tiene una alta especificidad por su sustrato, el TRH (Bauer, 1995). La PPII hidroliza el enlace de la pyroGlu-his del TRH. Es una metaloenzima de 260kDa insertada en la membrana celular con su sitio catalítico orientado hacia el espacio extracelular (Heuer et al., 1998). En el SNC, esta enzima se localiza en la membrana de células neuronales y no en células gliales (Bauer et al., 1990; Cruz et al., 1991). Mientras que en la adenohipófisis, se localiza preferentemente en las células lactótropas (Schomburg y Bauer, 1995). La localización de la PPII en el SNC es consistente con el papel que tiene en la degradación del TRH sináptico (Vargas et al., 1992).

Adicionalmente el TRH es degradado en suero por la acción de la tiroliberinasasa. Como la PPII, la tiroliberinasasa tiene un alto grado de especificidad por el TRH, es similar a la PPII (Schomburg y Bauer, 1995; Friedman et al., 1995; Nillni y Sevarino, 1999), y se ha sugerido que es sintetizada en el hígado (Schmitmeier et al., 2002).

Regulación del metabolismo del TRH en el eje neuroendócrino

Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis metabólica en respuesta a cambios externos como el frío. Además, estas hormonas regulan la actividad del eje tiroideo por retroalimentación negativa actuando a nivel hipofisario y a nivel central en el hipotálamo (Yen, 2001).

En el hipotálamo, las hormonas tiroideas regulan la síntesis del TRH y su liberación por retroalimentación negativa (Taylor et al., 1990). En las ratas adultas con hipotiroidismo primario, aumenta la concentración del RNAm de TRH en el NPV (Taylor et al., 1990).

La tiroidectomía efectuada en ovejas de la raza Suffolk, trae como consecuencia la pérdida de la retroalimentación negativa que ejercen las hormonas tiroideas sobre las neuronas TRHérgicas del NPV y aumenta significativamente la secreción hipotalámica del TRH con respecto a los animales eutiroideos; y la administración de T₄ revierte esta respuesta y normaliza la secreción del TRH (Dahl et al., 1994).

La expresión del TRH-R1 está regulada por diferentes señales extracelulares, incluyendo la concentración de hormonas periféricas como las hormonas tiroideas, las cuales disminuyen los niveles del RNAm del TRH-R1 en hipófisis de rata, tanto *in vivo* como en cultivos de células hipofisarias (De Lean et al., 1977; Gershengorn, 1978; Schomburg y Bauer, 1995) y paralelamente disminuye la respuesta del receptor a TRH.

La actividad de la PPII en la adenohipófisis de ratas está regulada por el TRH, por las hormonas tiroideas y por los estrógenos. Vargas y cols. (1994), reportaron que en un cultivo de células adenohipofisarias, el TRH disminuye la actividad de la PPII (por medio de la activación de sus receptores) a un 54% del control 16 horas después de la incubación con TRH.

Shomburg y Bauer (1995), reportan que la inyección i.p. de T₃ (30µg/100g peso corporal) aumenta la concentración del RNAm de la PPII en la adenohipófisis (10 veces por arriba del valor del control). En las ratas hipotiroideas (tratadas con *n*-propiltiouracil, 200 mg/litro en el agua para beber), el RNAm de la PPII disminuye a un 50% del control el primer día del tratamiento, en la adenohipófisis. El efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la PPII es específico de la adenohipófisis, ya que en cerebro la actividad de la enzima no cambia significativamente (Schomburg y Bauer, 1995; Lin y Wilk, 1998).

La tiroliberinasa también es regulada por la concentración de las hormonas tiroideas (Ponce et al., 1988), en el hipotiroidismo disminuye la concentración de esta enzima, mientras que en el hipertiroidismo aumenta (White et al., 1976). Además, en humanos la tiroliberinasa está asociada positivamente al índice de masa corporal (Friedman et al., 1995).

Glucocorticoides

Los glucocorticoides (GC) ejercen efectos específicos dependiendo del tejido sobre el cual actúan. Pueden aumentar o disminuir la síntesis de varias proteínas (ej. somatostatina y TRH) afectando el nivel de transcripción, así como la estabilidad del RNAm (Liu y Patel, 1995).

La corticosterona, el principal glucocorticoide en las ratas, puede regular el metabolismo del TRH. La administración de GC a ratas en el agua de consumo causa una disminución en la concentración del RNAm de pro-TRH en las neuronas del NPV del hipotálamo (Kakucska et al., 1995). En ratas adrenalectomizadas aumenta la concentración del RNAm de pro-TRH en el NPV del hipotálamo (Kakucska et al., 1995).

Estos efectos de los GC sobre el RNAm de TRH podrían explicar en parte la aparente contradicción del efecto del ayuno, en el cual disminuye la concentración de hormonas tiroideas y paradójicamente también está disminuido el contenido del RNAm de TRH en el hipotálamo (Blake et al., 1991).

Leptina y péptidos hipotalámicos

Se ha sugerido que la leptina juega un papel importante en la regulación neuroendócrina del eje HHT. En el ayuno disminuye la concentración de leptina y se inhibe el eje tiroideo mientras que el eje adrenal se activa (van Haasteren et al., 1995). Como consecuencia del ayuno, hay una disminución del RNAm de pro-TRH, así como de las hormonas tiroideas, y un aumento de corticosterona (Blake et al., 1991; van Haasteren et al., 1995). Estos efectos causados por el ayuno pueden revertirse con la inyección i.p. e i.c.v de leptina en ratas (Ahima et al., 1996; Legradi et al., 1997; Fekete et al., 2005). *In vitro*, la leptina aumenta la liberación del TRH hipotalámico de ratas ayunadas por 48hrs (Kim et al., 2000).

La leptina regula la biosíntesis de pro-TRH del NPV y su liberación hipotalámica (Fig.4): puede actuar directamente sobre las neuronas TRHérgicas del NPV (Kim et al., 2000) activando el promotor del gen de TRH *in vivo* (Guo et al., 2004), a través de la activación del transductor de señales y del activador de la transcripción 3 (STAT-3) (Guo et al., 2004; Huo et al., 2004); o puede actuar indirectamente sobre las células del ARC estimulando la expresión génica de POMC y por lo tanto a la α -MSH, e inhibiendo la expresión del NPY y del AgRP los cuales son péptidos orexigénicos (Kim et al., 2000; Nillni et al., 2000; Harris et al., 2001).

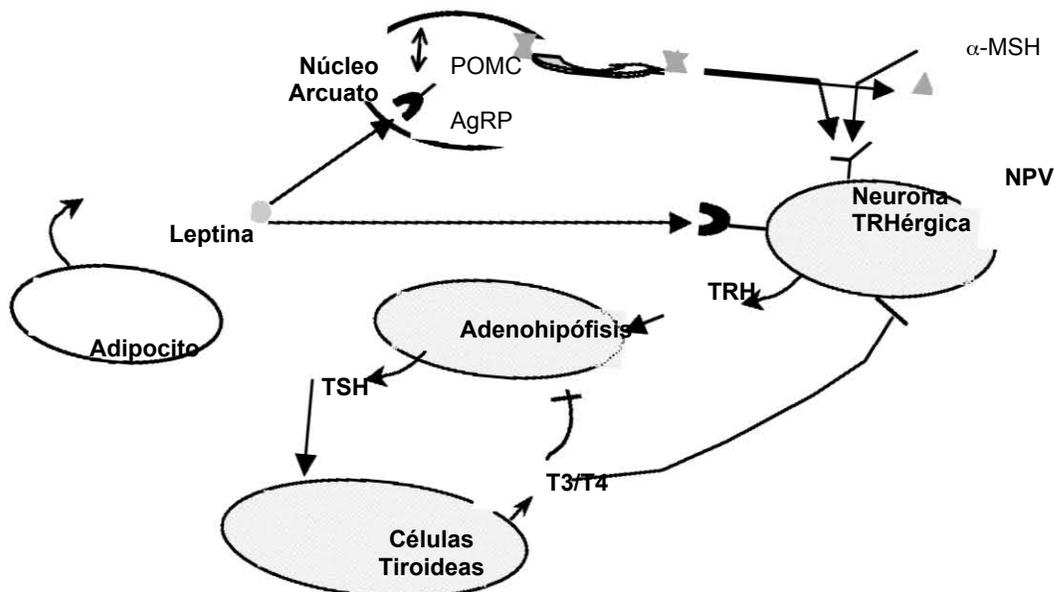


Fig.4 Regulación del eje tiroideo por la leptina a través de su acción directa o indirecta sobre las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo. Se requiere de una adecuada concentración de leptina para mantener la expresión hipotalámica de TRH, el cual es necesario para la producción normal de TSH y de hormonas tiroideas.

Otros Estímulos

El frío y la succión estimulan la liberación de TRH hipotalámico, acompañado de un aumento del RNAm de TRH en el NPV del hipotálamo (Uribe et al., 1993; Sánchez et al., 2001; Fjeldheim et al., 2005). La liberación de TRH en respuesta a la exposición al frío en ratas, la cual está mediada por mecanismos adrenérgicos (Arancibia et al., 1989) y trae como consecuencia una elevación en rápida de la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas. El estímulo de la succión en ratas, provoca la liberación de TRH, lo que induce la síntesis y liberación de prolactina, e involucra la activación de neuronas serotoninérgicas que proyectan del núcleo de rafe al hipotálamo (Barofsky et al., 1983; Uribe et al., 1993). Ambos estímulos aumentan también la concentración sérica de corticosterona (Uribe et al., 1993).

El TRH como neuromodulador

En cerebro, la mayor concentración del TRH (30% del total) se encuentra en el hipotálamo, y el resto (70%) se encuentra ampliamente distribuido en regiones extrahipotalámicas (Nillni y Sevarino, 1999) como la amígdala, el hipocampo y el núcleo accumbens (Lechan y Jackson, 1982; Méndez et al., 1987). Esta distribución fue confirmada por Tang y Man en 1991, demostrando que el TRH tiene un patrón de distribución en el cerebro muy parecido a Leu-enkefalina, sustancia P y somatostatina, encontrando una menor concentración en cerebelo.

Aparte de su función hormonal comúnmente conocida, éste péptido, también puede funcionar como neuromodulador debido a que presenta las siguientes características: más del 50% de TRH se localiza en terminaciones nerviosas, en el cerebro se encuentran receptores de alta afinidad para el TRH (Calzá et al., 1992), y además en el cerebro y la adenohipófisis es degradada por la PPII, la cual se encuentra cerca de los sitios de liberación del TRH (Schomburg et al., 1999).

El TRH induce varias funciones biológicas. La inyección intracerebroventricular (i.c.v.) de TRH en animales provoca distintos efectos como la inducción del despertar, tanto natural como de hibernación, incrementa la actividad motora y la motilidad gástrica, provoca taquicardia e hipertensión, mejora el aprendizaje y/o la memoria, eleva la temperatura corporal, revierte el efecto narcótico provocado por el alcohol, tiene efectos antidepresivos y disminuye la ingesta de alimento y agua (Horita, 1998).

REGULACIÓN DE LAS NEURONAS TRHérgicas EN DIFERENTES MODELOS RESTRICCIÓN ALIMENTARIA Y ANOREXIA

Se conoce muy poco sobre la respuesta de las neuronas TRHérgicas en la anorexia (disminución del consumo voluntario de alimento y disminución de peso). Nuestro laboratorio ha estudiado diferentes paradigmas que provocan cambios en el metabolismo de este péptido en el SNC:

En las ratas adultas con un periodo de ayuno de 48 h, aumenta la concentración de TRH en la eminencia media mientras que disminuye en el NPV; ocurre también una disminución del contenido de TRH y de su RNAm en la amígdala (de Gortari et al., 2000); mientras que en ratas jóvenes (21 días de edad), aumenta la concentración de TRH en el hipocampo y disminuye en el núcleo accumbens en el ayuno (de Gortari et al., 2000). Esto sugiere que el papel TRH en la conducta alimentaria es independiente, al de su papel como hormona.

En estudios previos hemos encontrado diferencias neuroendócrinas y metabólicas entre el modelo de anorexia por deshidratación y el de la restricción alimentaria forzada, ambos grupos son modelos de una desnutrición energético-proteica. Se encontró que estos dos grupos redujeron su consumo de alimentos un 90% con respecto al control, además ambos grupos de animales redujeron significativamente de peso. En la restricción alimentaria encontramos una actividad del eje tiroideo disminuida: una inhibición de la liberación hipotalámica del TRH y una disminución sérica de TSH. Mientras que en la anorexia encontramos una actividad del eje tiroideo aumentado: una mayor liberación hipotalámica del TRH y un aumento en la concentración sérica de TSH.

También encontramos otras diferencias inesperadas entre la restricción alimentaria y la anorexia, observamos un aumento significativo de la actividad de la PPII en la adenohipófisis y de la tiroliberinasa en suero.

Por otro lado, encontramos una regulación diferencial en el contenido del TRH extrahipotalámico entre la anorexia por deshidratación y el grupo de restricción alimentaria en el hipocampo y la corteza insular.

ASPECTOS GENERALES DE LA HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA (CRH)

El Sistema CRHérgico

El sistema CRHérgico está formado por el péptido CRH, las urocortinas (péptidos endógenos análogos al CRH, los cuales al ser inyectados i.c.v. disminuyen la ingesta de alimento), sus receptores CRH-R1 y CRH-R2, y la proteína de unión a CRH (CRH-BP) (Richard et al., 2002). El CRH coordina las respuestas endócrinas, autonómicas y conductuales al estrés (Gennady et al., 2001), incluyendo conductas relacionadas a la ansiedad, a la ingesta de alimentos y participa en el aprendizaje y la memoria (De Souza, 1995; Heinrichs y Richard, 1999; Servatius et al., 2005; Radulovic et al., 1999; Sánchez et al., en prensa).

Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)

El CRH es un péptido de 41 aa, es la principal hormona hipofisiotrópica que regula el eje HHA (Vale et al., 1981). El CRH con funciones endócrinas es sintetizado en las células parvocelulares del NPV del hipotálamo, y es liberado de la eminencia media a la circulación portahipofisaria; en la adenohipófisis estimula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la cual a su vez estimula la síntesis y secreción de los glucocorticoides de las glándulas adrenales (Jacobson, 2005). La vasopresina es otra hormona que actúa sinérgicamente con CRH para estimular la secreción de ACTH de la adenohipófisis (Aguilera y Rabadan-Diehl, 2000).

Los GC participan en la homeostasis y en las respuestas del organismo al estrés, y tienen un papel importante en la regulación de la actividad basal del eje HHA y en la terminación de las respuestas al estrés, actuando directamente en la adenohipófisis para inhibir la síntesis de ACTH, y en hipotálmo y regiones extrahipotálamicas para inhibir la síntesis de CRH (Chrousos y Kino, 2005; Rashid y Lewis, 2005). Estos efectos los ejercen a través de sus receptores citoplasmáticos (Pratt, 1990; Smith y Toft, 1993), receptores a mineralocorticoides (MR) y receptores a glucocorticoides (GR). La unión del ligando al receptor, provoca la translocación del receptor al núcleo, en donde interactúa con un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el DNA para la activación o inactivación de genes (Rousseau, 1984; Kumar y Thompson, 2005).

Participación de CRH en el balance energético y la conducta alimentaria

Estudios fisiológicos han demostrado que la expresión de CRH en el NPV es regulada de manera diferencial tanto en estados negativos como en estados positivos del balance de energía. En ratas diabéticas (Chan et al., 2003) y en ratas con una sobrealimentación involuntaria (a través de una gastrostomía para alimentar a las ratas por medio de una sonda) (Seeley et al., 1996) aumenta la expresión de CRH en el NPV. Mientras que en la restricción calórica (Brady et al., 1990) y en situaciones que aumentan la demanda energética como el embarazo y la lactancia (Douglas et al., 1994; Walker et al., 2001), el ejercicio (Timofeeva et al., 2003) y la exposición al frío (Hatalski et al., 1998) disminuye la expresión de CRH en el NPV.

Además de la función hipofisiotrópica que tiene CRH, también puede actuar como un neuropéptido anorexigénico. La administración central de CRH produce cambios en la conducta alimentaria y en el metabolismo (Richard et al., 2002; Mastorakos y Zapanti, 2004). La inyección de CRH en el NPV inhibe la ingesta espontánea de alimentos y la ingesta inducida por el ayuno, mientras que el bloqueo de la síntesis y expresión de CRH provoca un aumento en el consumo de alimentos (Momose et al., 1994; Spina et al., 1996). La inyección i.c.v. de CRH o de su análogo urocortina también activa el sistema simpático, lo que aumenta la lipólisis y el gasto energético (Cullen et al., 2001; Solinas et al., 2005). Se ha sugerido que el efecto anorexigénico de CRH está mediado por el receptor tipo 2 de CRH (CRH-R2) mientras que el receptor tipo 1 de CRH (CRH-R1) media los efectos metabólicos (Heinrichs et al., 1997; Smagin et al., 1998, Zorilla et al., 2004). La anorexia inducida por la urocortina y por CRH es atenuada con la administración de un oligonucleótido antisentido de CRH-R2, y un antagonista selectivo para CRH-R2 inhibe los efectos que tiene CRH sobre la conducta alimentaria y el peso corporal (Smagin et al., 1998; Inui, 2000; Cullen et al., 2001; Richard et al., 2002).

El papel que tiene CRH en la inducción de la anorexia y en la pérdida de peso en ratas resulta de la acción de otros péptidos como CART, α -MSH y NPY; y de señales periféricas como la leptina que participan en la regulación del balance energético y la conducta alimentaria (Lu et al., 2003; Sarkar et al., 2004; Wittmann et al., 2005). *In vitro*, la inyección de CART en el NPV estimula la liberación de

CRH e *in vivo*, aumenta la concentración plasmática de ACTH (Stanley et al., 2001). La inyección i.c.v. de leptina (Arvaniti et al., 2001), la de un agonista de α -MSH (MTII) (Lu et al., 2003) y de NPY (Suda et al., 1993) induce la expresión de CRH en el NPV y un aumento en la concentración de ACTH y corticosterona sérica; estos efectos se revierten con la administración de un antagonista de MC4R (HS014) (Lu et al., 2003). Además, la administración central de α -MSH evita la disminución de la expresión de CRH en el NPV durante el ayuno (Fekete et al., 2000). Entonces, en el ayuno, disminuye la concentración de leptina; esto estimula la síntesis de α -MSH e inhibe la síntesis de CART y NPY; estos mecanismos neuronales disminuyen la expresión de CRH en el NPV durante la restricción alimentaria (Leibowitz y Wortley, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN

La anorexia nervosa está asociada a una serie de alteraciones neuroendócrinas. El eje hipotálamo-hipófisis adrenal está activado, mientras que existe controversia sobre cuáles son las alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis tiroideo (Muñoz y Argente, 2002).

Algunos estudios reportan que las concentraciones circulantes de T_4 y T_3 están disminuidas y que hay una respuesta retardada de TSH a TRH (Tamai et al., 1986), mientras que otros estudios reportan una concentración baja o normal de T_4 , una baja concentración de T_3 y una concentración normal o baja de TSH (Muñoz y Argente, 2002). Además se ha encontrado que en pacientes con anorexia el TRH presente en el líquido cerebroespinal se encuentra disminuido (Lessem et al., 1994).

En algunos modelos conductuales animales, como los que a continuación se describen, se han encontrado cambios en la vía TRHérgica del Sistema Límbico y se ha demostrado que, dependiendo del estímulo utilizado, se modifica el metabolismo del TRH de manera diferencial. Midiendo diferentes eventos del metabolismo del TRH en ratas, se ha observado que los cambios en su concentración o síntesis y en la actividad de su enzima degradativa (PPII), son específicos de cada región del cerebro y dependientes del estímulo utilizado. Por ejemplo, en conductas asociadas con la anorexia como la ansiedad, utilizando el modelo animal de enterramiento defensivo, se observa un aumento en la síntesis del TRH en el hipotálamo y una disminución en la síntesis del TRH con un aumento en su contenido en la amígdala (Gutiérrez 2002; 2005); en modelos genéticos de ansiedad está aumentado un péptido crítico del precursor del TRH, la Prepro-TRH 178-199, en el NPV del hipotálamo (Suzuki et al., 2001).

Además, en estudios previos hemos encontrado una respuesta diferencial de las neuronas TRHérgicas del hipotálamo, el hipocampo y la corteza insular entre la restricción alimentaria y la anorexia, a pesar de que en ambos grupos experimentales se presentaron los mismos cambios neuroendocrinos: disminución de la concentración sérica de leptina y aumento de la de corticosterona, además disminuyeron su consumo de alimento y tuvieron una pérdida de peso similar. Estos resultados apoyan que el TRH está involucrado en conductas que se han asociado a la anorexia.

También se ha reportado que en las ratas con anorexia inducida por deshidratación durante un periodo de cinco días aumenta la concentración del RNAm de CRH en el hipotálamo lateral; estos cambios no se observan en las ratas con una restricción alimentaria. El aumento en la concentración del RNAm de CRH en el hipotálamo lateral está correlacionada positivamente con la intensidad de la anorexia que presentan los animales (Watts et al., 1999), por lo que se ha implicado al CRH de esta región en la anorexia inducida por deshidratación; sin embargo no se han cuantificado los elementos involucrados en el metabolismo CRHérgico en este modelo de anorexia. Además, las neuronas CRHérgicas del hipotálamo lateral tienen innervaciones hacia el NPV (Watts et al., 1999), por lo que es factible que las neuronas TRHérgicas del NPV sean uno de los blancos de la acción de CRH en la anorexia inducida por deshidratación. Por esta razón vamos a cuantificar los elementos involucrados en el metabolismo de CRH, estos son el CRH, CRH-R2 el cual modula los efectos anorexigénicos del CRH y es regulado de manera diferencial en el HVM en el ayuno (Makino y cols. 1998); y GR, en este estudio solamente analizamos la expresión de GR debido a que es el receptor que se activa durante situaciones de estrés y el que está involucrado en la regulación neuroendócrina del eje adrenal (de Kloet, 2003).

Proponemos identificar si el sistema TRHérgico del NPV participa en la regulación de la conducta alimentaria y posiblemente en la anorexia inducida por deshidratación, y si el CRH es un posible efector de las neuronas TRHérgicas del NPV en las ratas con anorexia.

Además de medir los elementos involucrados en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en el NPV, también se van a estudiar en el sistema límbico, debido a que actualmente se reconoce que dentro del SNC existen estructuras extrahipotalámicas, que forman parte del sistema límbico y que participan en la conducta alimentaria (Berthoud 2002; Wynne et al., 2005). Por ejemplo, las cortezas frontal e insular actúan como centros de reconocimiento de sabores (Ogawa et al., 1990, 1992; Morris y Dolan 2001). La amígdala y el núcleo accumbens participan en procesos de recompensa relacionados al placer del consumo de alimentos y están involucrados en la codificación del valor emocional que se le da a los alimentos. El hipocampo participa en aspectos de aprendizaje y memoria

entre ellos, procesos necesarios para la identificación de sabores (Carelli e Ijames, 2000; Morris y Dolan 2001). En humanos, las neuronas de la corteza frontal, insular y de la amígdala se activan en respuesta a un sabor dulce o salado (Morris y Dolan 2001; O'Doherty et al., 2000). Estudios de resonancia magnética en mujeres con anorexia han demostrado una activación de las neuronas de la amígdala (Berthoud, 2002).

Para estudiar el papel del TRH en la conducta alimentaria, se utilizó un modelo animal de anorexia por deshidratación (restricción voluntaria del consumo de alimentos) y un modelo de restricción alimentaria (restricción forzada), induciendo una disminución de peso similar.

III. HIPÓTESIS

Los cambios específicos en la expresión de los elementos involucrados en la transmisión TRHérgica en el NPV y en regiones del SNC involucradas en la conducta alimentaria, así como cambios en el RNAm del receptor de TRH en la adenohipófisis, de ratas con anorexia contra la restricción alimentaria, sugerirán la participación de las neuronas TRHérgicas en los cambios neuroendócrinos que se presentan en la anorexia.

IV. OBJETIVOS

General:

Definir la participación del TRH en la regulación de la conducta alimentaria en el modelo de anorexia inducida por deshidratación.

Específicos:

1. Comparar los cambios en el sistema TRHérgico del Sistema Límbico (NPV, corteza frontal, amígdala, núcleo accumbens, hipocampo, corteza insular), en un modelo animal de anorexia (restricción voluntaria del consumo de alimento) contra un modelo animal de consumo restringido de alimento (restricción forzada).
2. Definir si los receptores para TRH y glucocorticoides en la adenohipófisis participan en los cambios neuroendócrinos de la anorexia inducida por deshidratación.
3. Comparar los cambios en la vía TRHérgica con los de la vía CRHérgica en la anorexia inducida por deshidratación y en la restricción alimentaria.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se usaron ratas Wistar hembras en edad adulta (250-300 g de peso) que se mantuvieron en cajas individuales para registrar su consumo de alimento y agua, en condiciones controladas de 12 h de luz-oscuridad (luz de las 7 a las 19 hrs) y a una temperatura controlada de 25 °C en el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM". Hubo una semana de adaptación antes de iniciar el experimento durante el cual los animales tuvieron acceso ilimitado a la comida (Rodent Diet 5001: 28% de proteínas, 12.13% de grasas y 59.8% de hidratos de carbono) y agua. Los animales se pesaron en la semana de adaptación para que los grupos iniciaran el experimento con el mismo peso promedio.

Experimento

El experimento se realizó en dos grupos independientes de animales para verificar la confiabilidad de los resultados, cada uno tuvo una duración de siete días. A todas las ratas se les dio 50 g de alimento por día (excepto a las de restricción alimentaria) y 150 ml de líquido. Los grupos que se formaron para realizar el experimento fueron los siguientes:

1. Control: con consumo de alimento y agua *ad libitum*.
2. Grupo de Anorexia (ANX): con consumo de alimento *ad libitum* y una solución salina al 2.5% como agua (Watts AG et al, 1999).
3. Grupo de Restricción Alimentaria (RA): con consumo de agua *ad libitum* y la misma cantidad de alimento que consumía en promedio el grupo de la anorexia. Este grupo se desfasó un día para conocer el consumo de alimento del grupo de la anorexia en el día anterior.

Los animales se pesaron diariamente de 9-10:00 h y se alimentaron hasta el día del sacrificio (día 8).

Se registró también el consumo de comida y agua diario.

Todos los animales fueron sacrificados al octavo día de iniciado el experimento por decapitación, entre las 10 y 12:00 AM. Se colectó la sangre de cada rata en tubos de centrifugación para obtener el suero. Se extrajeron los cerebros y se almacenaron a -70 °C hasta su disección. Las adenohipófisis se separaron y almacenaron a -70 °C para cuantificar la expresión de los RNAm's del TRH-R1, de la PPII y de GR, por RT-PCR.

Las regiones del cerebro que se disecaron manualmente, utilizando como referencia un atlas de cerebro de rata (Palkovits y Brownstein, 1988), fueron las siguientes: NPV, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo, y corteza insular. Estas regiones del Sistema Límbico fueron seleccionadas dada su participación en el control del peso corporal, en la discriminación de sabores, en la selección de nutrimentos y en la regulación del apetito (Berthoud, 2002). De cada región disecada se extrajo el RNA total (**Anexo 1**) y posteriormente se semicuantificó el RNAm de TRH, TRH-R1, TRH-R2, CRH, CRH-R2 y GR (**Anexo 2**). El suero se usó para medir la concentración sérica de proteínas por el método de Bradford (1951) (**Anexo 3**), la concentración de leptina por el método de ELISA (**Anexo 4**) (para evaluar cambios metabólicos que pudieran deberse o estar relacionados con la pérdida de peso) y la concentración de corticosterona (**Anexo 5**) (como medida del estrés), TSH (**Anexo 6**) y hormonas tiroideas (T3 y T4) (**Anexo 7**) (como medida de la adaptación del eje tiroideo).

Análisis de resultados

Se obtuvo para todos los datos (n=13/grupo) la media y el error estándar de la media (ESM). Para realizar comparaciones entre los grupos se usó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido por la prueba post-hoc de Fisher (software Stat View, SAS Institute). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando la $p < 0.05$. Las gráficas de los RNAs del TRH, TRH-R1, TRH-R2, CRH, CRH-R2, GR y PPII muestran el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100%.

VI. RESULTADOS

Ingesta de alimento (Fig. 5) y líquido (Fig. 6)

Al grupo de la **RA** se le dio la misma cantidad de alimento que consumió el grupo de la ANX, con acceso ilimitado a agua. Disminuyó su consumo de agua significativamente a partir del día 5 del experimento. El séptimo día su consumo de agua disminuyó un 45% (43 ± 4.1 ml; $p < 0.05$) con respecto al control (78.4 ± 5.1 ml; 100%).

El grupo de la **ANX** tuvo acceso ilimitado a su alimento; sin embargo, desde el día uno del experimento hasta el día 7 redujo su consumo de alimento significativamente. Para el séptimo día su consumo se redujo un 83% (2.4 ± 0.6 g; $p < 0.05$) con respecto al control (13.8 ± 0.7 g; 100%); y aumentó su consumo de líquido (solución salina al 2.5%) significativamente desde el día dos hasta el día 7 del experimento. El séptimo día su consumo de líquido aumentó un 76% (137.8 ± 5.9 ml; $p < 0.05$) con respecto al control (78.4 ± 5.1 ml; 100%).

La reducción del consumo de alimento provocó que en los grupos de la ANX y de la RA disminuyera significativamente su ingesta proteica en un 83% (0.54 ± 0.12 g, $p < 0.05$ con respecto al control 3.2 ± 0.2 g, 100 %; cálculos basados en la tabla nutricional Rodent Diet 5001).

Peso (Fig. 7)

En el día 1 del experimento no hubo cambios significativos en el peso en ningún grupo experimental. El grupo de la **RA** tuvo una pérdida significativa de peso (216.0 ± 5 g; $p < 0.05$) con respecto al control (227.6 ± 3.2 g) a partir del día 4 del experimento. Al final del experimento el grupo de la RA perdió 13 % de peso (201.6 ± 4.7 g; $p < 0.05$) con respecto al control (233 ± 4 g; 100%).

En cambio en el segundo día del experimento el grupo de la **ANX** ya había perdido peso significativamente (215.4 ± 3.3 g; $p < 0.05$) con respecto al control. Al final del experimento (día 7) el grupo de la ANX bajó un 20% (187 ± 5.7 g; $p < 0.05$) con respecto al control.

No se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

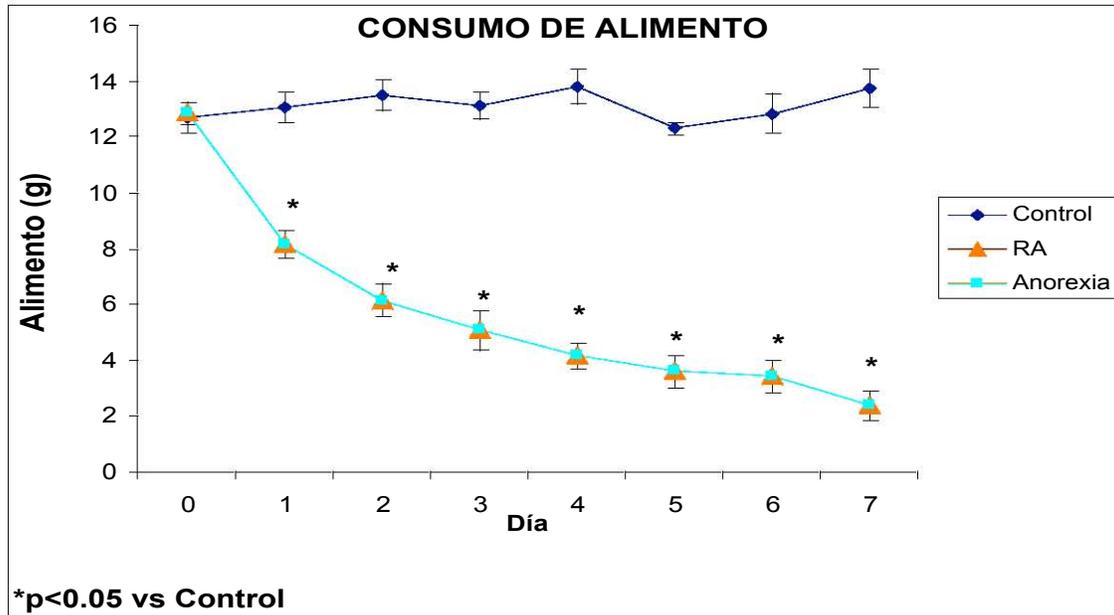


Figura 5. Consumo de alimento durante los 7 días del experimento. Los resultados muestran la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

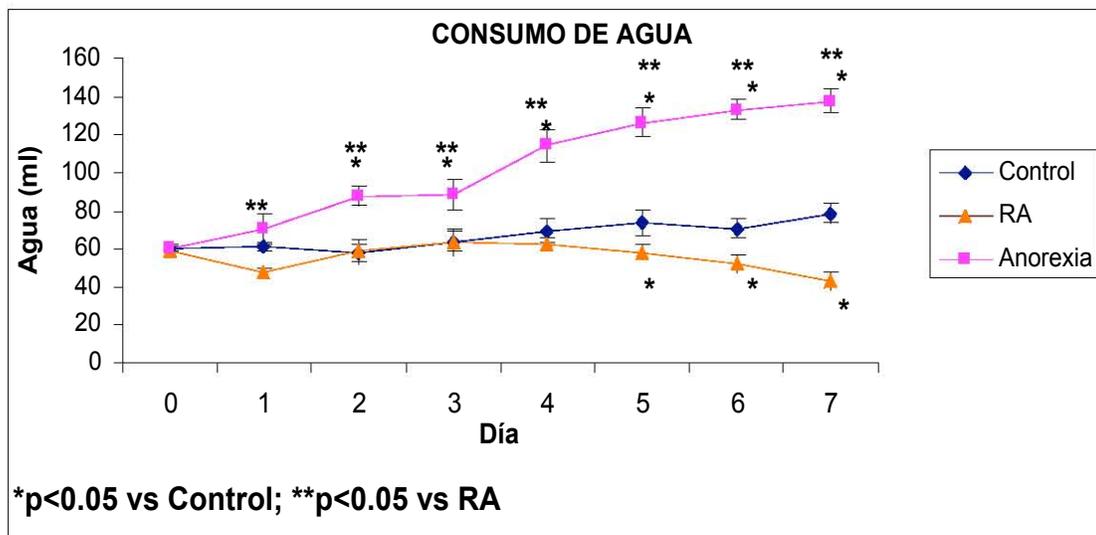


Figura 6. Consumo de líquido durante los 7 días del experimento. Los resultados muestran la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

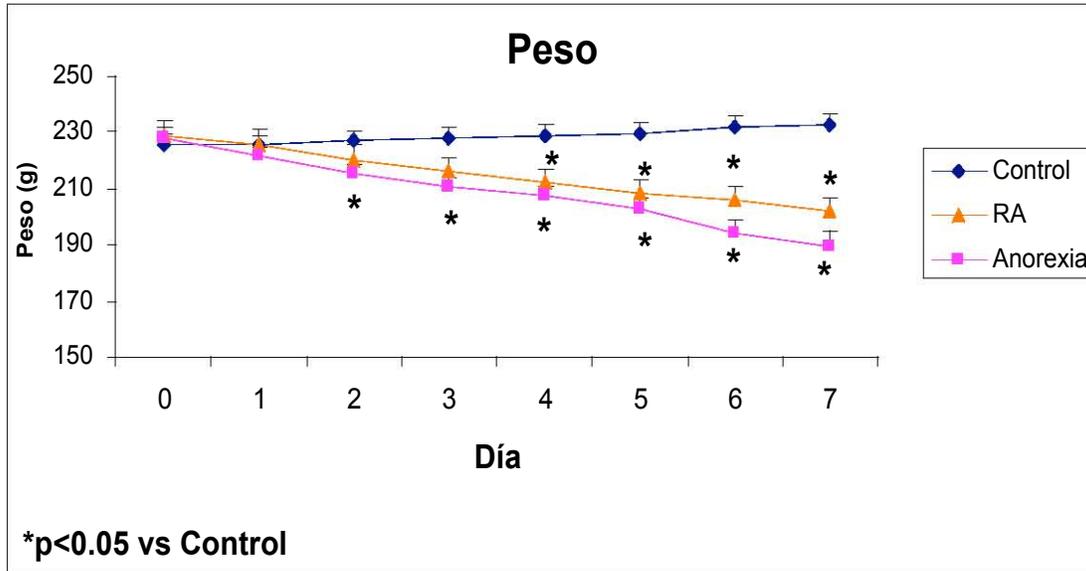


Figura 7. Cambio en el peso corporal durante los 7 días del experimento. Los resultados muestran la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

Proteína sérica al día 7 (Fig. 8)

No hubo cambios significativos en la concentración sérica de proteínas en ningún grupo experimental con respecto al control al día 7 del experimento (RA: $93 \pm 3.3\%$, ANX: $98 \pm 3.4\%$ vs control: $100 \pm 1.9\%$, $132.95 \mu\text{g/ml}$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

Leptina al día 7 (Fig. 9)

La disminución de la leptina es una señal periférica que permite al animal conservar energía y estimula la ingesta de alimentos. Se observaron los mismos cambios en ambos grupos experimentales. En la RA y la ANX la concentración de leptina disminuyó significativamente. En la RA la concentración sérica de leptina disminuyó un 68% ($136 \pm 14.7 \text{ pg/ml}$; $p < 0.05$) con respecto al control ($422 \pm 36.7 \text{ pg/ml}$; 100%); y en la ANX disminuyó un 64% ($151 \pm 23.4 \text{ pg/ml}$; $p < 0.05$) con respecto al control. No se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

Corticosterona al día 7 (Fig. 10)

La restricción de alimento es una condición estresante. La concentración sérica de corticosterona aumentó significativamente en la RA un 206% y en la ANX aumentó un 168% con respecto al control (RA: 426.6 ± 40.1 ng/ml, ANX: 373.3 ± 18.7 ng/ml vs control: 139.2 ± 12.8 ng/ml; $p < 0.05$).

No se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

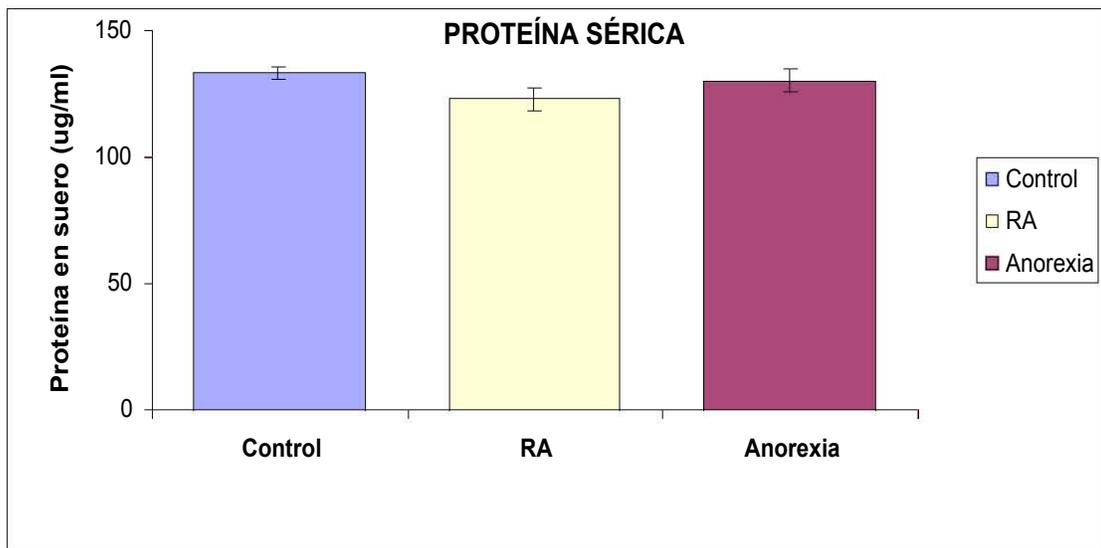


Figura 8. Proteína en suero, día 7. Resultados expresados como la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

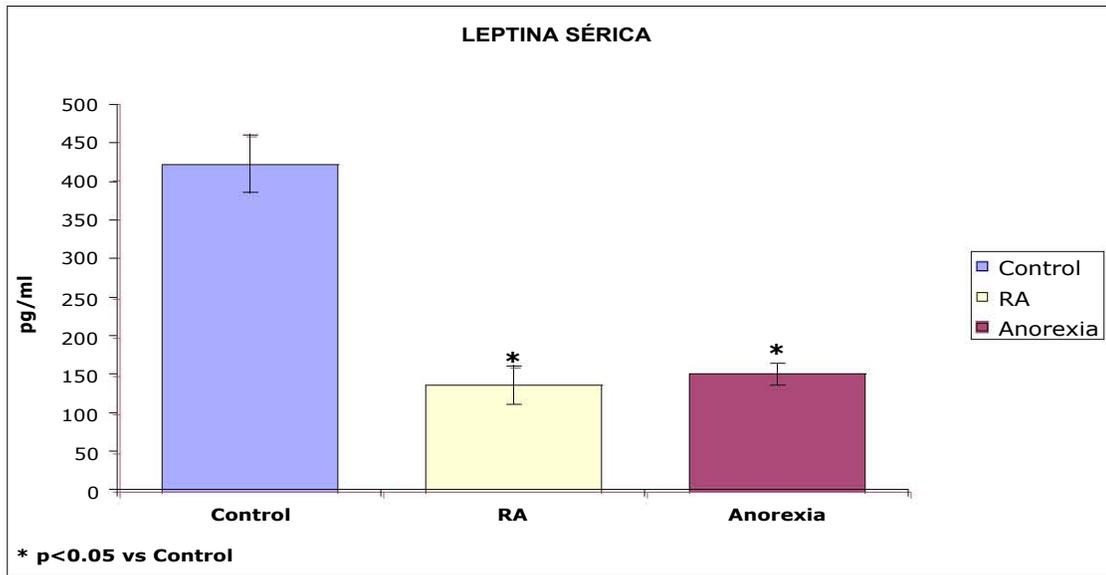


Figura 9. Leptina en suero día 7. Resultados expresados como la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

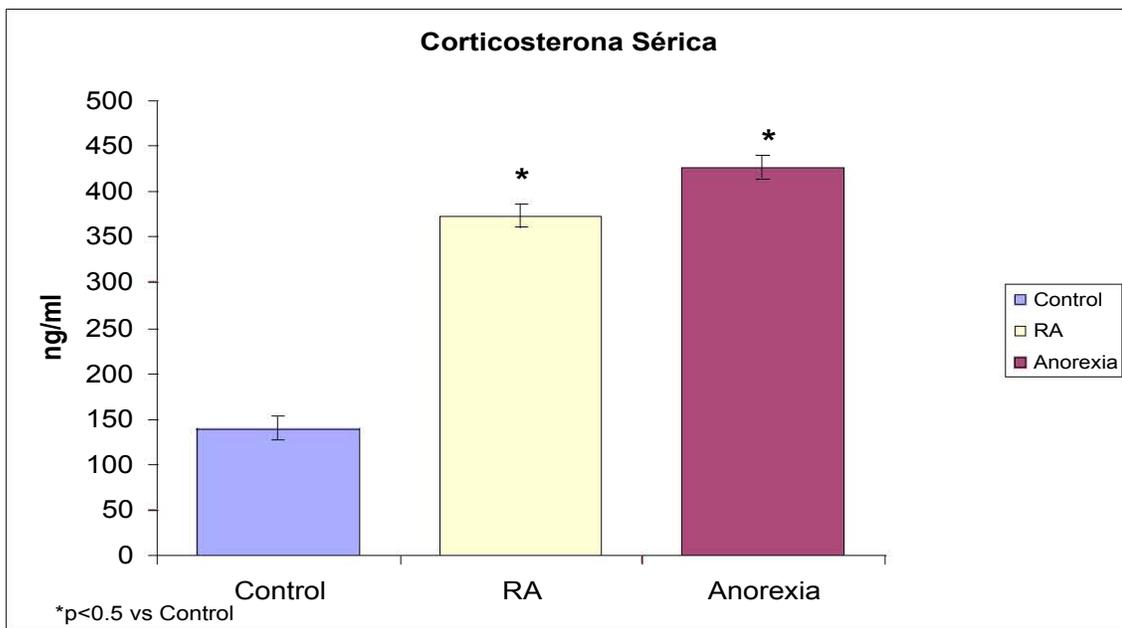


Figura 10. Corticosterona en suero, día 7. Resultados expresados como la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

CAMBIOS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDEO EN EL DÍA 7:

NPV DEL HIPOTÁLAMO (Fig. 11):

RNAm de proTRH. En el grupo de la RA los niveles del RNAm de proTRH disminuyeron significativamente un 29% ($70.86 \pm 6.32\%$; $p < 0.05$) con respecto al control ($100 \pm 6.85\%$) y disminuyeron significativamente un 35% con respecto a la ANX ($105.52 \pm 10.43\%$; $p < 0.05$).

En la ANX no se observaron cambios significativos ($105.52 \pm 10.43\%$) con respecto al control.

RNAm de TRH-R1. En la RA los niveles del RNAm de TRH-R1 disminuyeron significativamente un 27% ($72.5 \pm 7.99\%$; $p < 0.05$) con respecto al control ($100 \pm 9.77\%$) y disminuyeron significativamente un 37% con respecto a la ANX ($109.16 \pm 6.93\%$; $p < 0.05$). No se encontraron cambios significativos los niveles del RNAm de TRH-R1 en la ANX con respecto al control.

RNAm de TRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R2 en ningún grupo experimental (RA: $73.24 \pm 10.51\%$, ANX: $91.97 \pm 18.43\%$) con respecto al control ($100 \pm 14.33\%$). Tampoco se encontraron cambios significativos entre la RA y la ANX.

Adenohipófisis (Fig. 12):

RNAm de TRH-R1. En la RA no se encontraron cambios significativos los niveles del RNAm de TRH-R1 ($139.17 \pm 22.47\%$) con respecto al control ($100 \pm 14.21\%$). En cambio en la ANX los niveles del RNAm de TRH-R1 disminuyeron significativamente un 34% ($66.12 \pm 11.25\%$; $p < 0.05$) con respecto al control y un 73% con respecto a la RA ($p < 0.05$).

RNAm de la PPII. En la RA no se encontraron cambios significativos los niveles del RNAm de la PPII ($109.54 \pm 13.7\%$) con respecto al control ($100 \pm 15.7\%$). En cambio en la ANX los niveles del RNAm

de la PPII disminuyeron un 41% ($58.96 \pm 7.25\%$; $p < 0.05$) con respecto al control y un 50% con respecto a la RA ($p < 0.05$).

Hormonas:

TSH (Fig. 13)

En la RA la concentración sérica de TSH disminuyó significativamente un 40% (1 ± 0.09 ng/ml; $p < 0.05$) con respecto al control (2 ± 0.2 ng/ml).

La concentración sérica de TSH en la ANX aumentó significativamente un 44% (3 ± 0.4 ng/ml; $p < 0.05$) con respecto al control y un 85% con respecto a la RA ($p < 0.05$).

Hormonas tiroideas (Fig. 14)

En la RA la concentración sérica de T3 disminuyó significativamente un 30% con respecto al control (51 ± 4 ng/dl vs control: 73 ± 5 ng/dl; $p < 0.05$) y T4 disminuyó significativamente un 49% con respecto al control (RA: 0.99 ± 0.11 μ g/dl vs control: 1.9 ± 0.3 μ g/dl; $p < 0.05$).

En la ANX la concentración sérica de T3 disminuyó significativamente un 27% con respecto al control (ANX: 53.6 ± 3 ng/dl ; $p < 0.05$); en cambio T4 aumentó significativamente un 202% con respecto al control (ANX: 5.9 ± 0.6 μ g/dl ; $p < 0.05$). Este aumento de T4 en la ANX también fue significativo con respecto a la RA (aumentó 250% vs la RA; $p < 0.05$).

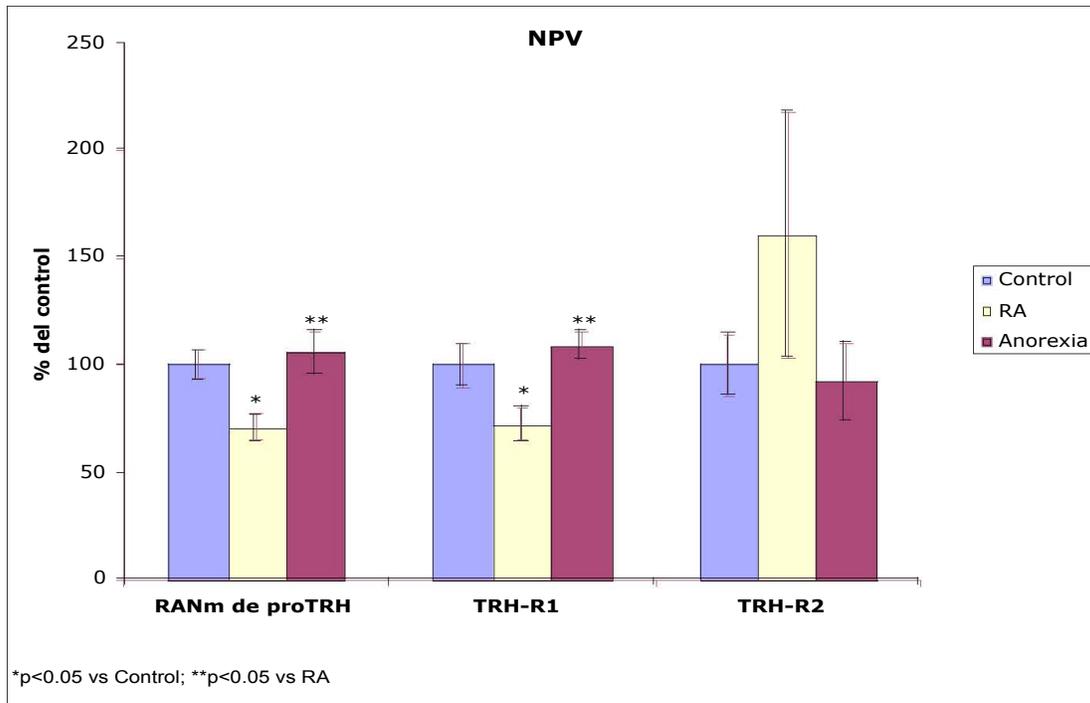
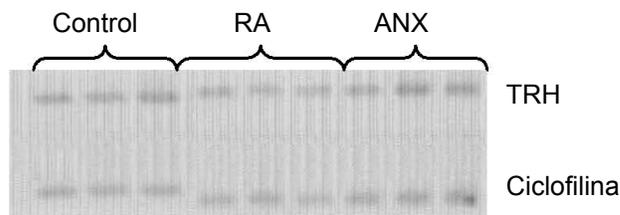


Figura 11. Cambios del metabolismo TRHérgico en el NPV, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de proTRH/ciclofilina, TRH-R1/ciclofilina, TRH-R2/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

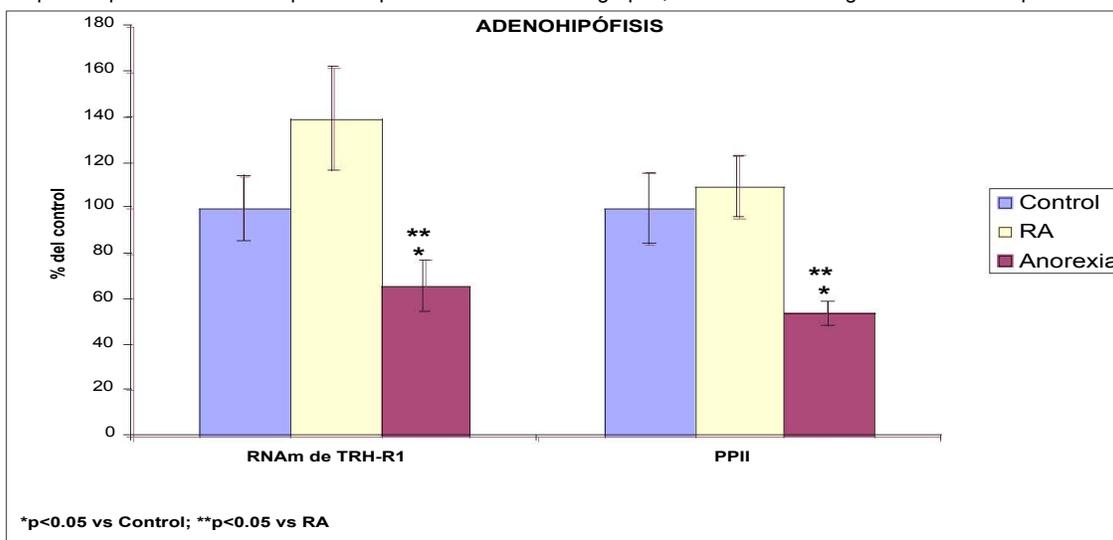


Figura 12. Cambios en el metabolismo TRHérgico en la adenohipófisis, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de TRH-R1/ciclofilina, PPII/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

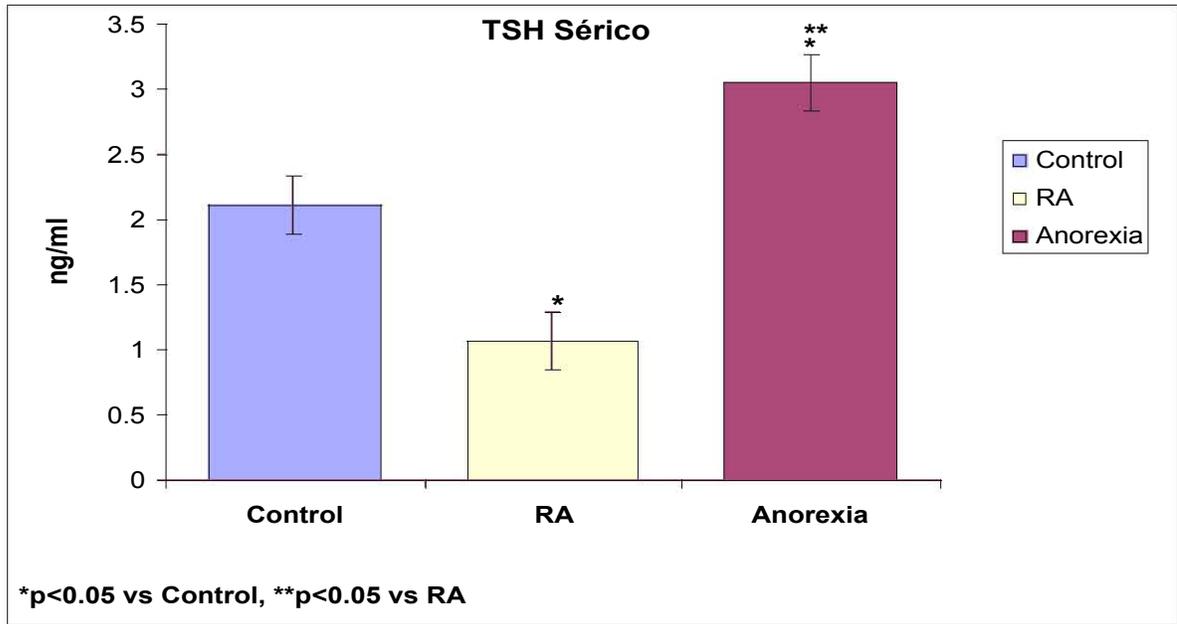


Figura 13. Tirotopina en suero, día 7. Resultados expresados como la media \pm ESM; se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p<0.05$.

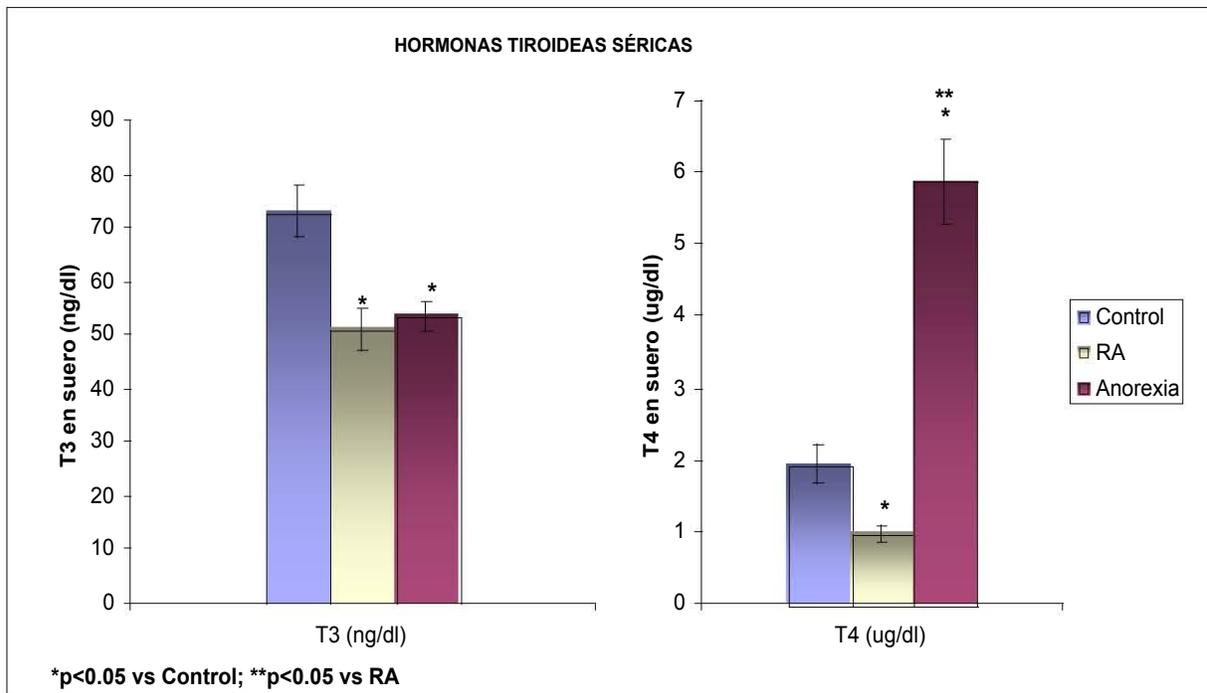


Figura 14. Hormonas Tiroideas (T3 y T4) en suero, día 7. Resultados expresados como la media \pm ESM (n=13); se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p<0.05$.

CAMBIOS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL DEL DÍA 7:

NPV DEL HIPOTÁLAMO (Fig. 15):

RNAm de proCRH. Los niveles del RNAm de proCRH tanto en la RA como en la ANX disminuyeron significativamente con respecto al control. En la RA los niveles del RNAm de proCRH disminuyeron un 29% con respecto al control (RA: $78 \pm 8.1\%$ vs control: $100 \pm 9.6\%$; $p < 0.05$). En la ANX los niveles del RNAm de pro-CRH disminuyeron un 26% con respecto al control (AN: $74.3 \pm 5.04\%$; $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre la RA y la AN.

RNAm de CRH-R2. En la RA no se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de CRH-R2 con respecto al control (RA: $97.6 \pm 17.9\%$ vs control: $100 \pm 9.61\%$). En cambio en la ANX los niveles del RNAm de CRH-R2 disminuyeron significativamente un 51 % con respecto al control (ANX: $49.3 \pm 18\%$; $p < 0.05$) y un 48% con respecto a la RA ($p < 0.05$).

RNAm de GR. Los niveles del RNAm de GR en la RA disminuyeron significativamente un 29% con respecto al control (RA: $71 \pm 8.8\%$ vs control: $100 \pm 2.6\%$; $p < 0.05$) y disminuyeron significativamente con respecto a la ANX un 20% (ANX: $91.4 \pm 5.1\%$; $p < 0.05$). En la ANX no se encontraron cambios significativos la expresión de GR con respecto al control.

Adenohipófisis (Fig. 16):

GR RNAm. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de GR en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $142.7 \pm 24.5\%$, ANX: $84.8 \pm 14.2\%$ vs control: $100 \pm 17\%$). Entre la RA y la AN se encontró una diferencia significativa del 58% ($p < 0.05$).

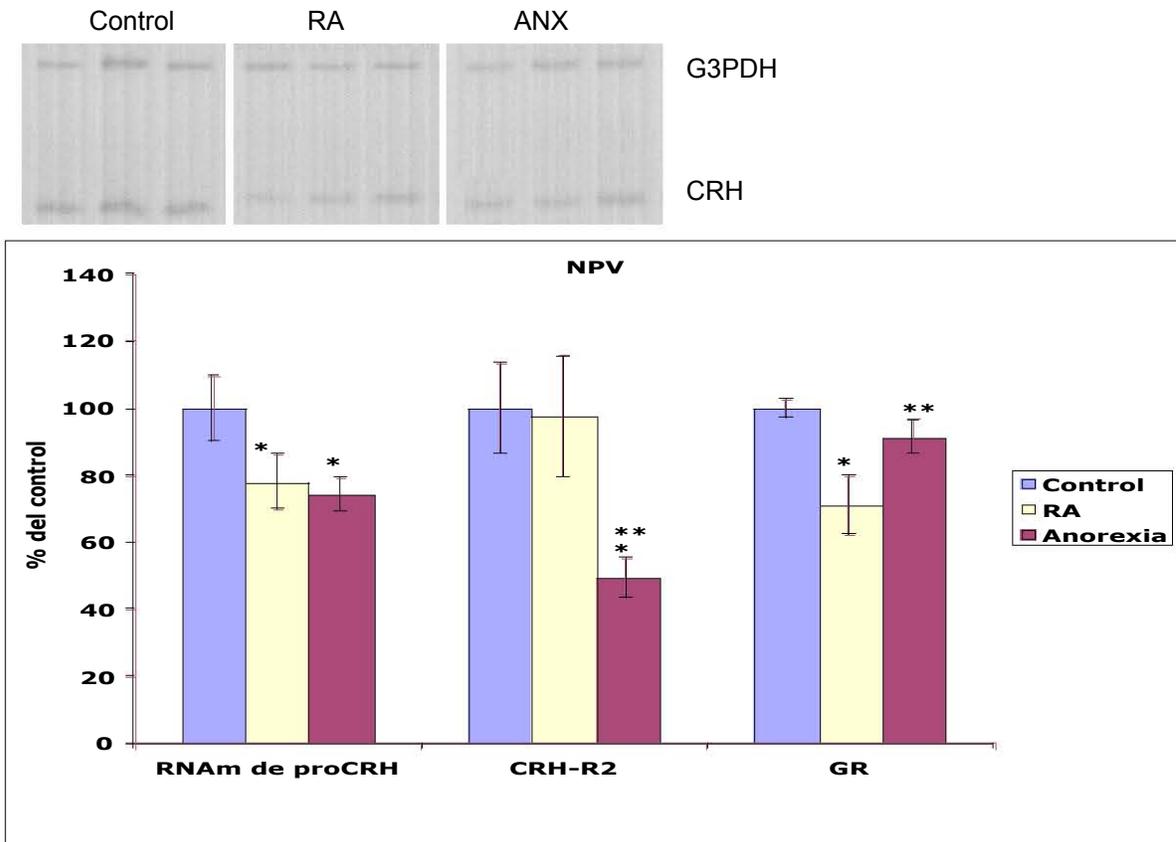


Figura 15. Cambios en la Vía CRHérgica en el NPV, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de proCRH/G3PDH, CRH-R2/ciclofilina, GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

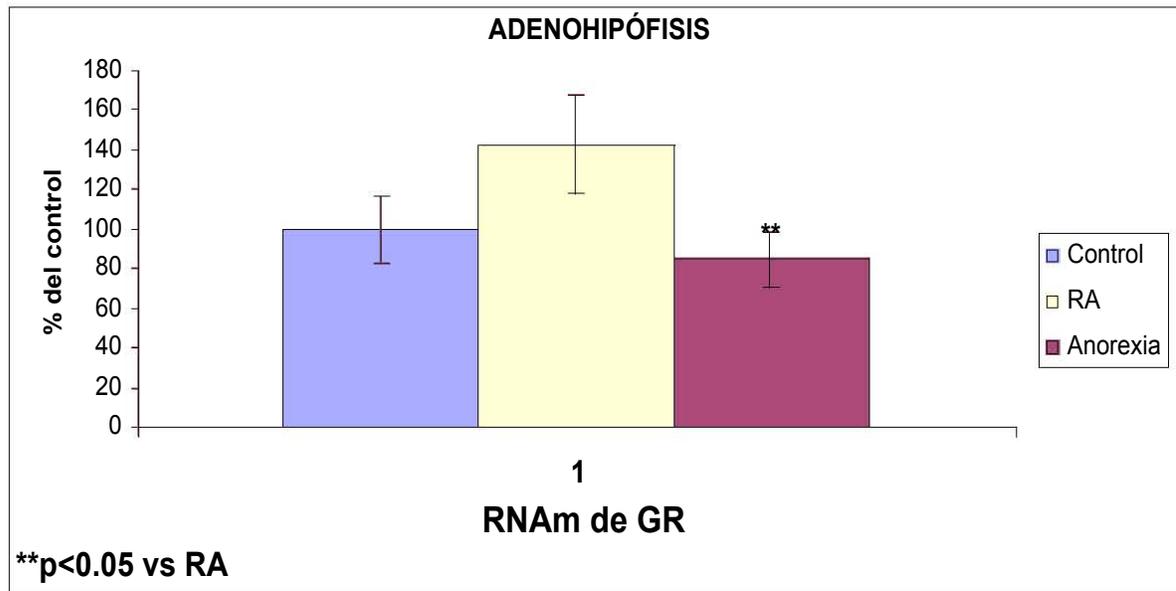


Figura 16. Expresión del receptor a glucocorticoides (GR RNAm) en la adenohipófisis, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

CAMBIOS EXTRAHIPOTALÁMICOS EN EL METABOLISMO TRHérgico Y CRHérgico:

AMÍGDALA (Fig. 17)

RNAm de proTRH. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de proTRH en la RA con respecto al control (RA: $96.4 \pm 10.4\%$ vs control: $100 \pm 6.5\%$). En la ANX los niveles del RNAm de proTRH disminuyeron significativamente un 21% con respecto al control (ANX: $78.7 \pm 7.8\%$; $p < 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNAm de TRH-R1. En la RA los niveles del RNAm de TRH-R1 disminuyeron significativamente un 36% con respecto al control (RA: $63.6 \pm 5.4\%$ vs control: $100 \pm 12.1\%$; $p < 0.05$), y disminuyeron significativamente un 38% con respecto a la ANX ($101.1 \pm 11.3\%$; $p < 0.05$). No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R1 en la ANX con respecto al control.

RNAm de TRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R2 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $107.8 \pm 5.4\%$, ANX: $89.2 \pm 5.6\%$ vs control: $100 \pm 5.3\%$). Se encontró una diferencia significativa entre la RA y la ANX, los niveles del RNAm de TRH-R2 en la ANX disminuyeron 18% con respecto la RA ($p < 0.05$).

RNAm de proCRH. En la RA los niveles del RNAm de proCRH disminuyeron significativamente un 18% con respecto al control (RA: $82.3 \pm 6.5\%$ vs control: $100 \pm 3.9\%$; $p < 0.05$), y disminuyeron significativamente un 19 % con respecto a la ANX (ANX: $101.9 \pm 6.6\%$; $p < 0.05$). No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de proCRH en la ANX con respecto al control.

RNAm de CRH-R2. En la RA los niveles del RNAm de CRH-R2 aumentaron significativamente un 101% (RA: $201.2 \pm 26.3\%$; $p < 0.05$) y un 41% (ANX: $140.5 \pm 15\%$; $p < 0.05$) en la ANX con respecto al control ($100 \pm 14\%$). Se encontró también una diferencia significativa del 60% entre la RA y la ANX ($p < 0.05$).

RNA_m de GR. En la RA los niveles del RNA_m de GR aumentaron significativamente un 34% con respecto al control (RA: 133.9 ± 9.5% vs control: 100 ± 5.1%; p<0.05) y con respecto a la ANX aumentaron un 46% (ANX: 87.6 ± 6.64%; p<0.05). No se encontraron cambios significativos los niveles del RNA_m de GR en la ANX con respecto al control.

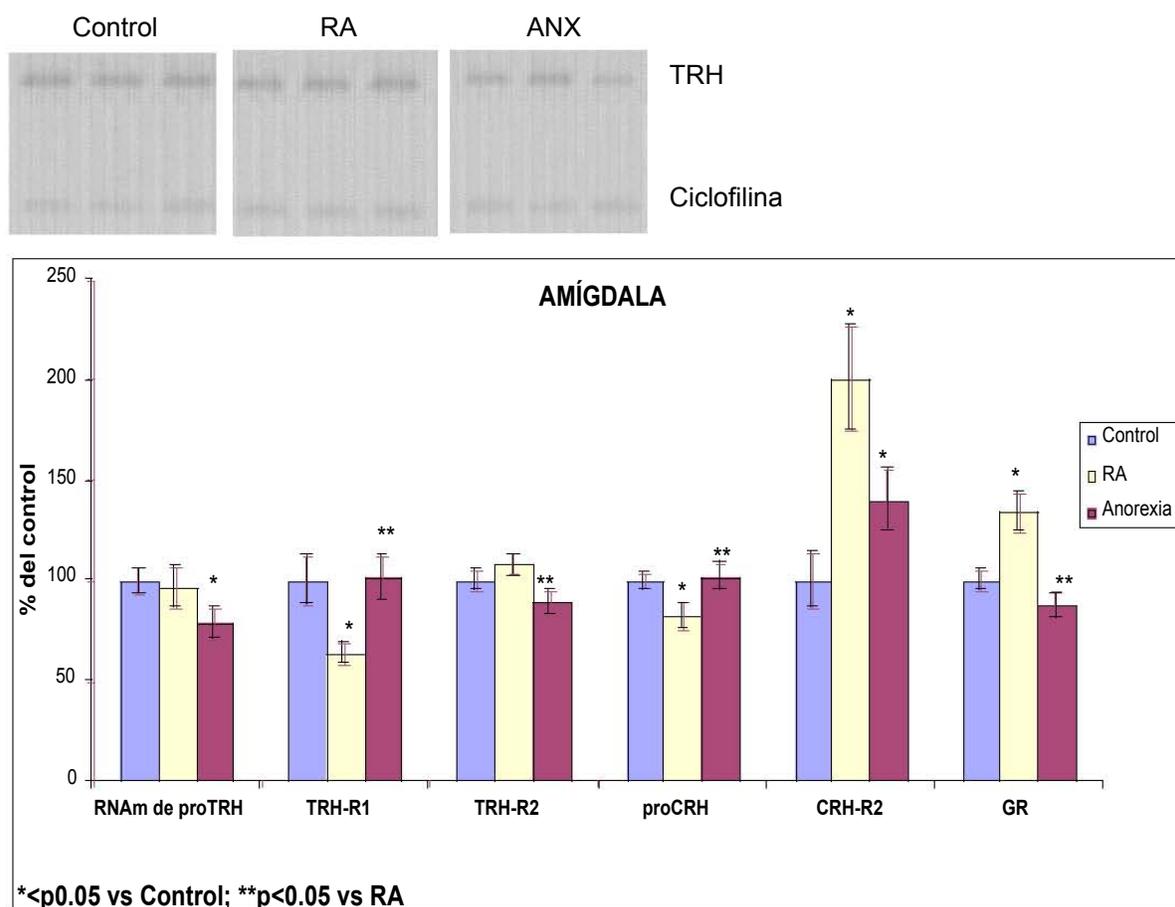


Figura 17. Cambios en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en la amígdala, día 7. Los datos se muestran como el promedio ± ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de proTRH/ciclofilina, TRH-R1/ciclofilina, TRH-R2/ciclofilina, proCRH/G3PDH, CRH-R2/ciclofilina, GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando p<0.05.

NÚCLEO ACCUMBENS (Fig. 18)

RNA_m de proTRH. Los niveles del RNA_m de pro-TRH en la RA y la ANX aumentaron significativamente un 97% (RA: $196.7 \pm 20.1\%$; $p < 0.05$) y un 68% (ANX: $168.1 \pm 17.4\%$; $p < 0.05$), respectivamente, comparado con el control ($100 \pm 13.8\%$). No se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNA_m de TRH-R1. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNA_m de TRH-R1 en la RA con respecto al control (RA: $127.4 \pm 13\%$ vs control: $100 \pm 14.5\%$). Los niveles del RNA_m de TRH-R1 en la ANX aumentaron significativamente un 140% con respecto al control (ANX: $240.31 \pm 53.17\%$; $p < 0.05$) y un 120% con respecto a la RA.

RNA_m de TRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNA_m de TRH-R2 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $81.2 \pm 10.8\%$, ANX: $104.1 \pm 3.8\%$ vs control: $100 \pm 8.6\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNA_m de proCRH. Los niveles del RNA_m de pro-CRH disminuyeron significativamente en un 34% en la RA ($66 \pm 5\%$; $p < 0.05$) y en un 22% en la ANX ($78.2 \pm 7.6\%$; $p < 0.05$) con respecto al control ($100 \pm 8.8\%$). No se encontraron cambios significativos entre la RA y la ANX.

RNA_m de GR. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNA_m de GR en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $116.1 \pm 9.7\%$, ANX: $111.2 \pm 10.7\%$ vs control: $100 \pm 8\%$). Tampoco se encontraron cambios significativos entre la RA y la ANX.

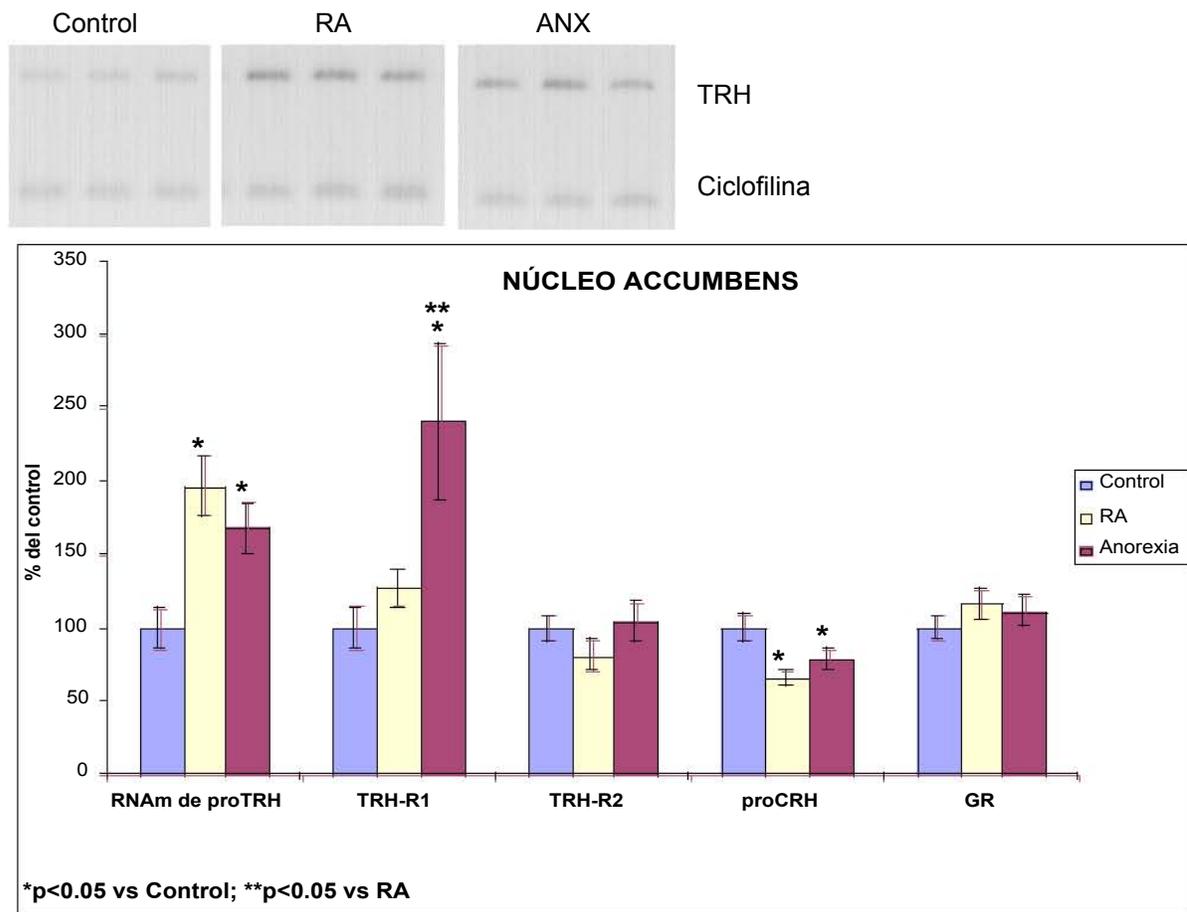


Figura 18. Cambios en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en el núcleo accumbens, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de proTRH/ciclofilina, TRH-R1/ciclofilina, TRH-R2/ciclofilina, proCRH/G3PDH, GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

HIPOCAMPO (Fig. 19)

RNAm de proTRH. En la RA los niveles del RNAm de pro-TRH aumentaron significativamente un 79% con respecto al control (RA: $178.8 \pm 18.9\%$ vs control: $100 \pm 7.9\%$; $p < 0.05$), y un 70% con respecto a la ANX ($109 \pm 7.9\%$; $p < 0.05$). En la ANX no se encontraron cambios significativos los niveles del RNAm de proTRH con respecto al control.

RNAm de TRH-R1. En la RA los niveles del RNAm de TRH-R1 disminuyeron significativamente un 42% con respecto al control (RA: $58.4 \pm 8.2\%$ vs control: $100 \pm 17\%$; $p < 0.05$). En la ANX no se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R1 con respecto al control (ANX: $89 \pm 11.6\%$), ni tampoco con respecto a la RA.

RNAm de TRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R2 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $87.2 \pm 8.5\%$, ANX: $106.6 \pm 12\%$ vs control: $100 \pm 8.6\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNAm de proCRH. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de proCRH en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $102.3 \pm 4.4\%$, ANX: $98.4 \pm 3.1\%$ vs control: $100 \pm 8.4\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNAm de CRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de CRH-R2 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $140.3 \pm 25.8\%$, ANX: $143.2 \pm 26.2\%$ vs control: $100 \pm 15.2\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNAm de GR. No se encontraron cambios significativos los niveles del RNAm de GR en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $103.7 \pm 6.1\%$, ANX: $96.6 \pm 5.5\%$ vs control: $100 \pm 6.2\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

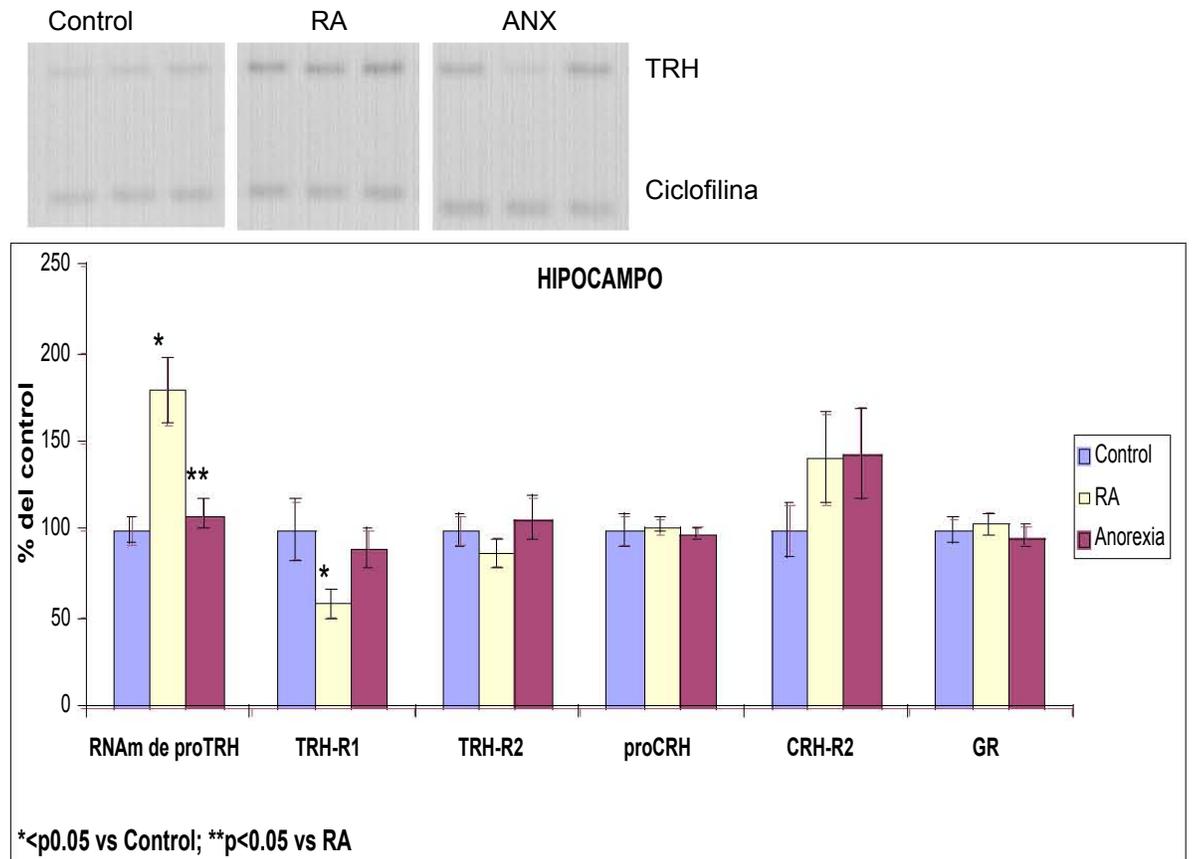


Figura 19. Cambios en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en el hipocampo, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de proTRH/ciclofilina, TRH-R1/ciclofilina, TRH-R2/ciclofilina, proCRH/G3PDH, CRH-R2/ciclofilina, GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

CORTEZA FRONTAL (Fig. 20)

RNAm de proTRH. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de proTRH en la RA con respecto al control (RA: $97 \pm 21.9\%$ vs control: $100 \pm 11.75\%$). En la ANX los niveles del RNAm de proTRH disminuyeron significativamente un 46% con respecto al control (ANX: $54.2 \pm 7\%$ vs control: $100 \pm 11.7\%$; $p < 0.05$). No se encontraron cambios significativos entre la RA y la ANX.

RNAm de TRH-R1. En la RA los niveles del RNAm de TRH-R1 disminuyeron significativamente un 35% con respecto al control (RA: $64.7 \pm 10.3\%$ vs control: $100 \pm 9.5\%$; $p < 0.05$). No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R1 en la ANX con respecto al control (ANX: $79.5 \pm 5.9\%$), ni con respecto a la RA.

RNAm de TRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R2 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $99.8 \pm 10.7\%$, ANX: $117.4 \pm 10.5\%$ vs control: $100 \pm 4.7\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNAm de GR. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de GR en la RA con respecto al control (RA: $79.6 \pm 9.9\%$ vs control: $100 \pm 5\%$). No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de GR en la ANX con respecto al control (ANX: $87.3 \pm 5.2\%$ vs control: $100 \pm 5\%$) ni con respecto a la RA.

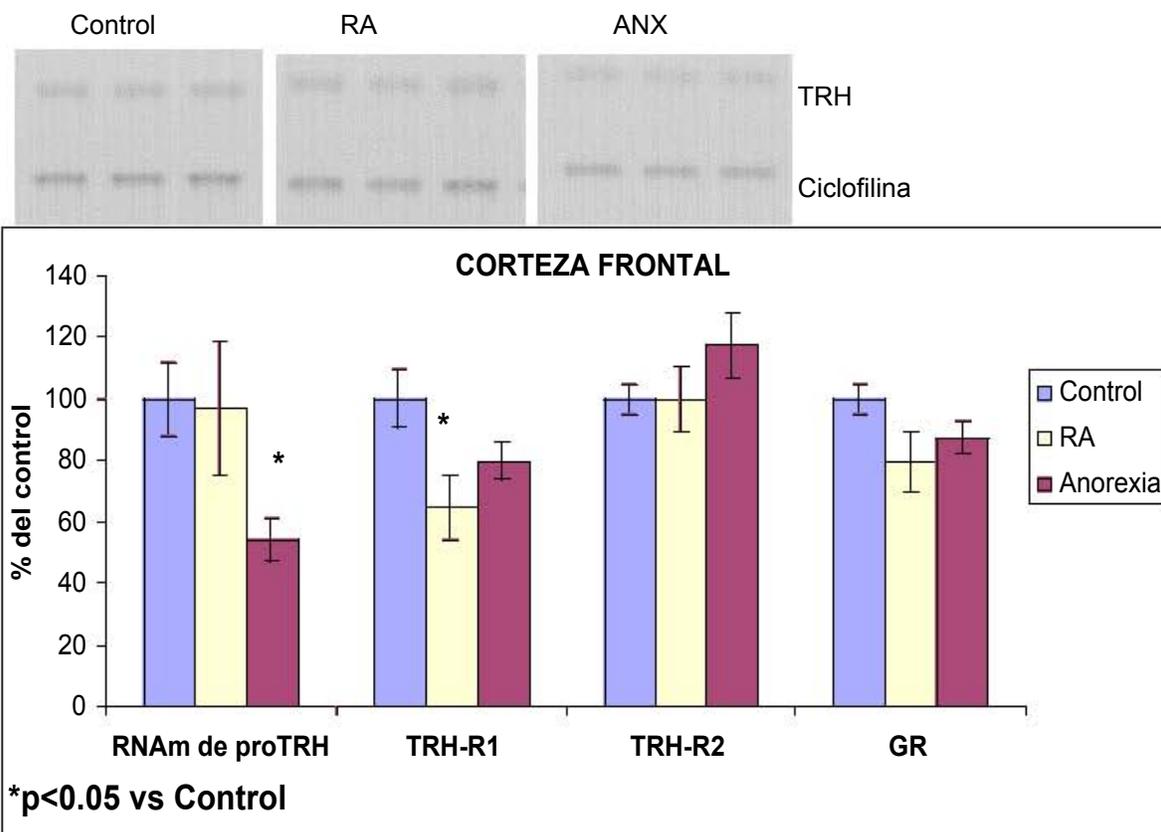


Figura 20. Cambios en el metabolismo TRHérgico y en los niveles del RNAm de GR en la corteza frontal, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de proTRH/ciclofilina, TRH-R1/ciclofilina, TRH-R2/ciclofilina, GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

CORTEZA INSULAR (Fig. 21)

RNAm de proTRH. No se detectó el proTRH en ningún grupo experimental ni en el grupo control.

RNAm de TRH-R1. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R1 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $60.4 \pm 8.9\%$, ANX: $139.7 \pm 20.2\%$ vs control: $100 \pm 15.8\%$). Se encontraron diferencias significativas entre la RA y la AN, los niveles del RNAm de TRH-R1 en la ANX aumentaron un 79% con respecto a la RA ($p < 0.05$).

RNAm de TRH-R2. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de TRH-R2 en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $88.2 \pm 20.7\%$, ANX: $65.9 \pm 12.7\%$ vs control: $100 \pm 10.3\%$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre la RA y la ANX.

RNAm de GR. No se encontraron cambios significativos en los niveles del RNAm de GR en ningún grupo experimental con respecto al control (RA: $100.1 \pm 14\%$, ANX: $101 \pm 10.7\%$ vs control: $100 \pm 4.1\%$). Tampoco se encontraron diferencia significativas entre la RA y la AN.

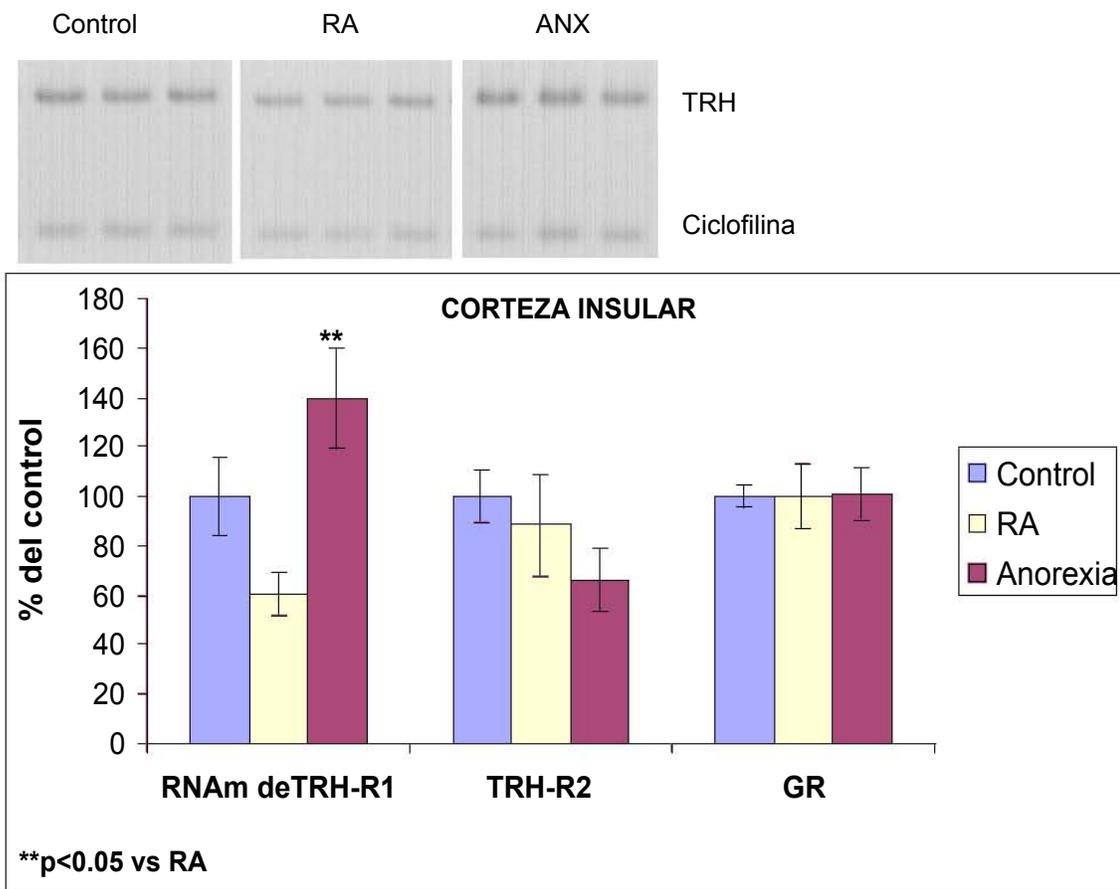


Figura 21. Cambios en el metabolismo TRHérgico y en los niveles del RNAm de GR en la corteza frontal, día 7. Los datos se muestran como el promedio \pm ESM en % del promedio del grupo control tomado como el 100% del cDNA de TRH-R1/ciclofilina, TRH-R2/ciclofilina, GR/ciclofilina. Se usó la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando $p < 0.05$.

VII. DISCUSIÓN

El SNC juega un papel fundamental en el control del metabolismo energético, en la regulación de la conducta alimentaria y del peso corporal (Berthoud 2002; Horvath et al., 2004). El hipotálamo es una región cerebral que regula el metabolismo energético, recibe e integra información de señales periféricas (por ejemplo, de hormonas como la insulina y la leptina) que reflejan el estado energético del organismo, como de otras regiones del cerebro (ej. amígdala, núcleo accumbens, hipocampo) a través de conexiones neuronales (Berthoud 2002; Leibowitz y Wortley 2004). Estas señales periféricas que llegan al cerebro regulan la expresión y la liberación de neuropéptidos, controlando la conducta alimentaria y el gasto energético, y por lo tanto el peso corporal (Leibowitz y Wortley 2004; Horvath et al., 2004; Wynne et al., 2005).

En este estudio analizamos los cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo y adrenal en la anorexia inducida por deshidratación (ANX) y en la restricción alimentaria forzada (RA). También estudiamos los efectos de la anorexia y la restricción alimentaria en el metabolismo TRHérgico y CRHérgico en estructuras del sistema límbico (amígdala, núcleo accumbens, hipocampo, corteza frontal y corteza insular) con el objetivo de definir la participación del TRH y el CRH en algún aspecto de la conducta alimentaria y su relación con la actividad del eje adrenal en respuesta a la anorexia inducida por deshidratación.

En este estudio se encontraron cambios metabólicos similares entre la RA y la ANX, tales como pérdida de peso corporal, una disminución importante de la ingesta de alimento y por lo tanto de proteínas y kcal totales (forzada en el caso de la RA y voluntaria en el caso de la ANX), disminución de la concentración sérica de leptina y aumento de corticosterona a los 7 días del experimento. Estos resultados coinciden con los reportados por Watts y cols. (1999) quienes utilizaron el mismo modelo de anorexia por deshidratación y cuyo experimento tuvo una duración de 5 días, y quien observó que en la RA y la ANX se dan los mismos cambios en la expresión de algunos neuropéptidos del ARC, tales como aumento del RNAm de NPY y una disminución del RNAm de POMC y neurotensina.

CAMBIOS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDEO

En la RA se presentaron cambios similares a los reportados para el ayuno (3 días) y la restricción alimentaria durante 3 y 7 semanas (van Haasteren et al., 1996; de Gortari et al., 2000); los niveles del RNAm de TRH en el NPV, así como la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas (T3 y T4) disminuyeron (Blake et al., 1991; van Haasteren et al., 1995, 1996; de Gortari et al., 2000). La disminución de TSH y por lo tanto de las hormonas tiroideas pudo deberse a una disminución de la liberación de TRH del hipotálamo, previamente reportado (Rondeel et al., 1992; van Haasteren et al., 1995). En la RA, ya sea por 7 días (Jaimes, 2003) o por 7 semanas (de Gortari et al., 2000) no cambia el contenido de TRH en el NPV, mientras que en la eminencia media se observa una acumulación del péptido, lo que interpretamos como una disminución de la liberación del péptido del hipotálamo.

La disminución de la expresión de TRH del NPV en la RA y el bloqueo de la retroalimentación negativa por la disminución de la concentración sérica de T3, en parte, es una consecuencia de la disminución de la concentración sérica de la leptina. Esta hormona, sintetizada por el tejido adiposo blanco, puede estimular la expresión del gen de TRH directamente a través de la activación de sus receptores localizados en las neuronas TRHérgicas del NPV (Nillni et al., 2000; Harris et al., 2001), o indirectamente a través de la activación del α -MSH y de la inhibición del NPY, los cuales tienen innervaciones en las neuronas de TRH del NPV y además estas neuronas expresan el receptor de α -MSH (MC4R) (Fekete et al., 2000; Harris et al., 2001).

Otro elemento que también puede ser el responsable de la inhibición en la síntesis de TRH en el NPV de las ratas con RA es la corticosterona, que a través de la activación de su receptor (GR) localizado en las neuronas TRHérgicas (Ceccatelli et al., 1989) y de la unión al elemento de respuesta a los glucocorticoides (GRE) en el promotor del gen de TRH (Lee et al., 1988), inhibe la síntesis de este péptido en el NPV (Kakucska et al., 1995; Alkemade et al., 2005).

Inesperadamente en la ANX no se observaron los cambios adaptativos del eje HHT relacionados a la restricción calórica (Blake et al., 1991; Van Haasteren et al., 1995; 1996): los niveles del RNAm de TRH en el NPV (en este estudio) y el contenido en la parte superior del hipotálamo (NPV) (Jaimes,

2003) no cambiaron, y las concentraciones séricas de TSH y T4 aumentaron. Estos aumentos de TSH y T4 pudieron deberse al aumento de la liberación hipotalámica de TRH, puesto que en la anorexia inducida por deshidratación durante 7 días la concentración de TRH en la eminencia media disminuye (Jaimes, 2003), sugiriendo un aumento de su liberación hacia la circulación portahipofisiaria. Estos resultados indican que el eje HHT en la ANX estuvo más activo que en el grupo de la RA.

También observamos que la tasa de conversión de T4 a T3 fue mayor en la ANX comparado con la RA [ya observado en pacientes con anorexia nervosa (Douyon et al., 2002)], lo cual sugiere una mayor síntesis de hormonas tiroideas. Por otra parte, la baja concentración de T3 que encontramos en la ANX pudo deberse a una disminución de la actividad de la desyodasa tipo I (responsable de convertir T4 a T3 sérico), lo cual ha sido reportado para el ayuno durante 48-72 hrs en las ratas (O'Mara et al., 1993; Aceves et al., 2003).

A pesar de que en la ANX también disminuyó la concentración sérica de leptina y aumentó la corticosterona con respecto al control, pero no disminuyó la expresión de TRH en el NPV; se puede sugerir que hay otros efectores responsables de los cambios diferenciales en la expresión de TRH del NPV, como el CRH. Watts y cols. (1999) observaron que la expresión de CRH en el hipotálamo lateral aumenta exclusivamente en la anorexia inducida por deshidratación durante 5 días, y este aumento se relacionó con el grado de anorexia de los animales; además, las neuronas CRHérgicas del hipotálamo lateral tienen proyecciones al NPV (Watts et al., 1999). No podemos descartar entonces que CRH sea un efector del TRH en el NPV, ya que otros péptidos en el ARC, como NPY, POMC (que afectan la expresión de TRH del NPV) y neurotensina cambian de igual manera en la ANX y la RA (Watts et al., 1999). Aunque hay otros efectores que se sabe regulan la expresión de TRH en el NPV en el ayuno, como CART y α -MSH, que podrían estar actuando de manera diferencial a nivel de las neuronas TRHérgicas.

La falta de adaptación de las neuronas TRHérgicas del NPV a la restricción calórica (voluntaria) observada en la ANX es un fenómeno similar a lo que ocurre en las ratas obesas Zucker (fa/fa) adrenalectomizadas. Estas ratas presentan un incremento en las reservas del tejido adiposo y una

hiperactividad del eje HHA; la adrenalectomía mejora su respuesta metabólica postprandial, y revierte la disminución de la expresión de TRH en el NPV que se da durante el ayuno (Duclos et al., 2005). El que las ratas con ANX en este estudio presentaran los mismos cambios que las ratas Zucker, sugiere que no podrían estar respondiendo al aumento de la concentración de corticosterona, lo que se refuerza por la falta de disminución de los niveles del RNAm de GR del NPV en la ANX comparado con la RA.

Actualmente no existe evidencia de que CRH pueda regular la expresión del TRH hipotalámico en mamíferos, pero la disminución en la expresión de CRH-R2 en el NPV que se observó exclusivamente en el grupo con anorexia apoya la idea de que uno de los efectores responsables de la falta de disminución en la expresión de TRH en el NPV pueda ser el CRH. Además, Watts y cols. (1999) reportaron que solamente en la anorexia inducida por deshidratación durante 5 días, y no en la restricción alimentaria aumenta la expresión del CRH en el hipotálamo lateral, y estas neuronas tienen proyecciones al NPV.

El TRH ejerce sus acciones a través de la activación de sus receptores, los cuales son regulados de manera diferencial por el TRH dependiendo del paradigma utilizado y de la estructura límbica estudiada (Gutiérrez et al., 2005; de Gortari et al., 2005; Sánchez et al., 2001). Se ha propuesto que TRH-R1 participa en la señalización del TRH en áreas cerebrales con funciones neuroendócrinas (ej. NPV y el ARC), además de que también se localiza en la adenohipófisis (Calzá et al., 1992; Heuer et al., 1998).

En la RA se encontró una disminución de los niveles del RNAm de TRH-R1 del NPV, mientras que en la ANX no se observaron cambios, lo que podría deberse a la acción del TRH proveniente de otras regiones hipotalámicas que tienen proyecciones hacia el NPV, como por ejemplo el hipotálamo lateral, el ARC y el núcleo dorsomedial (HDM) (Berthoud, 2002). Actualmente existe poca información sobre las proyecciones de las neuronas TRHérgicas. Se sabe que el HDM, el cual también participa en la regulación de la conducta alimentaria y del peso corporal (Bellinger y Bernardis, 2002) tiene proyecciones directas a las neuronas TRHérgicas del NPV (Mihály et al., 2001); además hay

expresión de TRH en el HDM en condiciones normales (sin ningún tipo de estímulo previo) (Heuer et al., 2000), y su expresión también es regulable en este núcleo hipotalámico (Lindblom et al., 2005); por ejemplo, la restricción alimentaria al 50% durante 12 días disminuye la síntesis de TRH en HDM (Lindblom et al., 2005). Se ha sugerido que el HDM podría estar involucrado en la regulación del eje HHT alterando la sensibilidad de las neuronas hipofisiotrópicas de TRH a la retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas (Mihály et al., 2001), a través de su receptor TRH-R1, lo que efectivamente ocurrió en la RA pero no en la ANX.

En este estudio no se encontraron cambios en la expresión de TRH-R2 en ningún grupo experimental. Se ha propuesto que TRH-R2 participa en procesos somatosensoriales y cognitivos (Heuer et al., 2002). Ya se ha observado en otros paradigmas una regulación de este receptor: en un modelo de ansiedad por enterramiento defensivo, la expresión de TRH-R2 aumenta en el NPV de ratas Wistar Kyoto (ratas genéticamente ansiosas) 30 minutos después de la prueba de enterramiento defensivo (Gutiérrez, 2005); lo que sugiere que nuestros animales responden a cambios específicos relacionados a la conducta alimentaria y no a la ansiedad.

Cambios en la Adenohipófisis

El TRH una vez liberado de la eminencia media y al llegar a la adenohipófisis, es inactivado en el espacio extracelular por la ectoenzima PPII (Heuer et al., 1998). Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el TRH puede disminuir la expresión y la actividad de la PPII a través de la activación de su receptor (TRH-R1) en adenohipófisis (Vargas et al., 1994, 2002).

En la RA no se encontraron cambios significativos en la expresión del TRH-R1 ni de la PPII; en cambio en la ANX, disminuyeron los niveles del RNAm del receptor y de la enzima en la adenohipófisis. Estos resultados parecen coincidir con la idea de que en la RA hay una liberación hipotalámica del TRH disminuida y por lo tanto hay una disminución de TSH y de las hormonas tiroideas en suero, lo que no ocurrió en la ANX. Además, la disminución de la concentración sérica de

TSH en la RA puede deberse a una disminución de los niveles del RNAm de TSH β previamente observado en la restricción alimentaria (restricción de un 50%) durante 12 días (Lindblom et al., 2005). En cambio en la ANX, al estar disminuida la expresión del TRH-R1 y de la PPII se apoya la idea de que efectivamente hay una mayor liberación del péptido que el grupo control y que en la RA, el cual regula negativamente a estos dos elementos del sistema TRHérgico, y que por lo tanto el eje HHT se encuentra activado.

Hasta el momento este es el primer estudio en demostrar que existe una regulación diferencial del eje HHT entre la RA (restricción forzada del consumo de alimento) y la ANX por deshidratación (restricción voluntaria del consumo de alimento) a pesar de que ambos grupos consumieron la misma cantidad de alimento y de que tuvieron una disminución de peso similar. Estos resultados sugieren que los animales con restricción alimentaria desarrollan un hipotiroidismo, mientras que los animales con anorexia desarrollan un hipertiroidismo primario, que puede ser responsable de la disminución de peso mayor (aunque no fue estadísticamente significativo) en comparación con la RA.

CAMBIOS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL

Se observaron cambios similares en la expresión de CRH del NPV en la RA a los reportados en estudios previos. El ayuno durante 4 días y la restricción alimentaria al 40-50% durante 2 semanas en ratas hembras disminuye la expresión de CRH en el NPV (Brady et al., 1990). Esta disminución probablemente se debe a la acción inhibidora de la corticosterona (Frim et al., 1990), la cual está aumentada en la RA; estudios *in vivo* han demostrado que los glucocorticoides disminuyen los niveles basales de la transcripción de CRH en el NPV (Herman et al., 2003; Ginsberg et al., 2003).

Lo mismo explica probablemente la disminución en los niveles del RNAm de GR que se observa en la RA, ya que la expresión de GR en el NPV *in vivo* disminuye por la acción de los glucocorticoides (Okret et al., 1986; Dong et al., 1988).

Estos resultados son diferentes a los reportados por Makino y cols. (2001), que no encuentran en el ayuno durante 4 días cambios significativos en la expresión de GR del NPV. Estas diferencias podrían

deberse al modelo utilizado por Makino (ayuno vs restricción alimentaria) y a la duración del estudio (4 días de ayuno vs 7 días de restricción alimentaria). Sin embargo, Makino y cols. (2001) también encuentran una disminución en la expresión de CRH del NPV en el ayuno, y lo atribuye a la acción de los glucocorticoides a través de GR, que aunque no cambia su expresión, menciona que el receptor está activado.

En otros modelos de estrés, como el estrés por inmovilización se ha reportado una disminución de los niveles del RNAm de GR en el NPV al mismo tiempo que hay un aumento en la concentración de corticosterona sérica (Makino et al., 1995; Herman et al., 1995).

En la ANX también disminuyó la expresión de CRH en el NPV; esto coincide con el estudio realizado por Watts y cols. (1999) donde reportan que en la anorexia inducida por deshidratación durante 5 días disminuyen los niveles del RNAm de CRH en el NPV. Ma y Aguilera (1999b) reportaron que existen otros factores, independientes a la corticosterona, que pudieran ser los responsables de la disminución en la expresión de CRH en el NPV en la ANX:

Podrían estar involucrados mecanismos intracelulares que regulen la expresión de CRH. Uno de estos mecanismos propuestos es el represor transcripcional ICER (represor temprano inducible del AMPc). ICER es producido vía la activación del segundo promotor del gen CREM (modulador del elemento de respuesta al AMPc) (Molina et al., 1993). ICER contiene el dominio de unión al DNA, pero no el dominio de transactivación de CREM, por lo tanto actúa como un inhibidor competitivo de activadores transcripcionales que se unen a CRE (elemento de respuesta al AMPc) (Foulkes et al., 1991).

ICER es un factor responsable de la inhibición de la expresión de CRH en el NPV. Los efectos del estrés por inmovilización en la expresión de CRH del NPV provocan que los niveles de RNAhn (RNA heteronuclear) de CRH en el NPV aumenten después de 30 minutos de la inmovilización, disminuyendo a los 60 minutos y regresando a valores basales a los 90 minutos, a pesar del aumento persistente de la corticosterona. Esta disminución es independiente a la acción de los glucocorticoides, ya que se observan cambios muy similares en ratas adrenalectomizadas. Los niveles del RNAm de ICER en el NPV aumentan después de 30 minutos de la prueba de estrés y

permanecen elevados por 4 horas independientemente de la concentración de los GC. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina han revelado un reclutamiento de CREM por el CRE de CRH, junto con una disminución en la unión de la polimerasa II en el NPV de las ratas inmovilizadas durante 3 horas.

Adicionalmente, se ha reportado que podría existir una autoregulación de las neuronas de CRH, se ha demostrado una retroalimentación negativa del mismo CRH a través de su receptor CRH-R1 en el NPV (Imaki et al., 1996). Estudios morfológicos han mostrado contactos de terminales, probablemente dendríticas, que contienen CRH con cuerpos celulares de CRH (Swanson et al., 1987).

La disminución de la concentración de leptina también puede estar contribuyendo a la reducción en la expresión de CRH en el NPV en la RA y la ANX. La leptina puede aumentar directamente la expresión de CRH en el NPV (Huang et al., 1998) o indirectamente estimulando la síntesis y liberación del α -MSH, el cual a través de su receptor MC4R, localizado en las neuronas CRHérgicas (Lu et al., 2003), aumenta la expresión de CRH en el NPV (Lu et al., 2003). La inyección i.c.v. de α -MSH a ratas en ayuno evita la disminución de los niveles del RNAm de CRH en el NPV (Fekete et al., 2000).

El CRH además de su función como regulador del eje HHA, también puede funcionar como neuropéptido en el SNC (Momose et al., 1999). Su liberación no regulada puede afectar la homeostasis nutricional (Schwartz et al., 1995) y cuando es inyectado i.c.v. a ratas produce anorexia (Momose et al., 1999). Además, la liberación de CRH inducida por el estrés provoca la pérdida de apetito, y estimula la liberación de corticosterona (Leibowitz y Wortley, 2004). Varios estudios han sugerido que la acción anorexigénica de CRH está mediada a través del receptor CRH-R2 (Smagin et al., 1998; Cullen et al., 2001; Zorilla et al., 2004).

En la RA no se encontraron cambios en los niveles del RNAm de CRH-R2 del NPV, estos resultados son similares a los reportados por Makino y cols. (1998), quienes mostraron que en el ayuno durante 4 días no cambia la expresión de CRH-R2 en el NPV, mientras que en el HVM sí disminuyen los niveles del RNAm de CRH-R2 en el mismo modelo (Makino et al., 1998), y en un paradigma donde

separan a las crías de las madres (estrés fisiológico/psicológico y disminuye la ingesta de alimento de manera voluntaria) (Eghbal-Ahmadi et al., 1999).

En cambio en la ANX se encontró una disminución específica de la expresión de CRH-R2 en el NPV, que no puede atribuirse al aumento de la corticosterona, ya que ni la adrenalectomía ni la administración de corticosterona modifican la expresión de CRH-R2 del NPV (Makino et al., 1997). Esta regulación diferencial entre la RA y la ANX sugiere que la vía CRHérgica a través de CRH-R2 podría estar participando en la disminución voluntaria de la ingesta de alimento.

Cambios en el RNAm de GR en la Adenohipófisis

Nuestros resultados de GR en la RA y la ANX son similares a los reportados para el ayuno y la restricción alimentaria. En el ayuno durante 4 días (Makino et al., 2001) y en la restricción alimentaria a un 50% durante 12 días (Lindblom et al., 2005), la expresión de GR en la adenohipófisis no cambia. A pesar de que la expresión de GR no haya cambiado en ningún grupo experimental, el eje HHA se encuentra activado, probablemente esto sea un mecanismo que permita que el eje adrenal siga funcional y responda durante periodos de estrés a largo plazo.

CAMBIOS EN ESTRUCTURAS EXTRAHIPOTALÁMICAS

AMÍGDALA

En la RA la expresión del TRH no cambió, mientras que la expresión del TRH-R1 disminuyó en la amígdala, ya hemos encontrado que el contenido del TRH en esta misma región está disminuida (Jaimes et al., 2003), sin embargo no podemos afirmar que hay una mayor liberación del péptido, ya que no se vió un cambio significativo en los niveles del RNAm de TRH en la RA. Las neuronas TRHérgicas de la amígdala responden a las condiciones de restricción energética, el ayuno durante 48 horas disminuye el contenido y la expresión del TRH en esta región del sistema límbico (de Gortari et al., 2000).

Por otro lado, la expresión del TRH-R1 también disminuye en la amígdala en ratas lactantes (Fjeldheim y cols., 2005), la cual es una situación de demanda de energía, similar a lo que sucede durante la restricción alimentaria.

En la ANX se encontró una disminución en la síntesis del TRH, mientras que la expresión del TRH-R1 no cambió con respecto al control, y en un estudio previo encontramos que el contenido del TRH en la amígdala está disminuido (Jaimes et al., 2003). Estos resultados sugieren que en la anorexia la actividad neuronal TRHérgica está disminuida.

Estudios previos han demostrado que existe una conexión intranuclear e internuclear entre los núcleos amigdalares. Esto indica que existe un procesamiento local de la información entrante a la amígdala (Afifi y Bergman; 2005).

En la RA y la ANX no se encontraron cambios significativos en la expresión del TRH-R2 en este estudio, estos resultados solo muestran que no se regula la expresión del TRH-R2. Se ha reportado una regulación de este receptor en un modelo animal de ansiedad (enterramiento defensivo) en donde disminuyen los niveles del RNAm de TRH-R2 en esta región.

Estos resultados indican que el sistema TRHérgico se regula de manera diferencial dependiendo del paradigma utilizado.

En la RA, un estrés de tipo metabólico, se encontró una disminución de la expresión de CRH; este resultado es similar al reportado para el ayuno por 4 días y al de la restricción alimentaria por 5 días (Makino et al., 2001, Watts et al., 1995). La disminución en los niveles del RNAm de CRH en la amígdala no se debe al aumento en la concentración de corticosterona, ya que en esta estructura los GC regulan positivamente la expresión de CRH, contrario a lo que sucede en el NPV (Shepard et al., 2000; Thompson et al., 2004).

Esta disminución de la expresión de CRH en la amígdala de las ratas con RA podría no ser específica a la restricción calórica, y podría estar relacionada con la ansiedad y/o la memoria de aspectos relacionados a la alimentación. En la amígdala, los niveles del RNAm de CRH disminuyen en un modelo animal de ansiedad (enterramiento defensivo) (Gutiérrez 2005) y en un modelo de memoria (Morris Water-maze) (Sánchez et al., 2005). Se sabe que la restricción alimentaria está asociada a una mayor ansiedad (Berthoud, 2002) y a alteraciones cognitivas (Yanai et al., 2004).

En cambio, en la ANX, la expresión de CRH en la amígdala no cambió, este resultado es similar a un estudio previo de Makino y cols (1996) que encontraron que en la anorexia por deshidratación la expresión de CRH en la amígdala disminuye al tercer día y regresa a valores basales al quinto día (Watts et al., 1996). Estos resultados sugieren que la anorexia por deshidratación cambia la expresión de CRH en la amígdala a corto plazo, pero conforme va siendo crónico, existe posiblemente una adaptación de las neuronas de CRH en esta región.

Adicionalmente, las neuronas CRHérgicas de la amígdala son reguladas en respuesta al alimento. El consumo voluntario de alimento aumenta el contenido y liberación de CRH en el núcleo central de la amígdala (Plamondon y Merali, 1998; Merali et al., 1998). En las ratas adrenalectomizadas disminuye la expresión de CRH en la amígdala y la ingesta de sucrosa durante 14 días aumenta la síntesis del péptido en esta estructura (Laugero et al., 2001).

Por lo que estos datos indican que el sistema CRHérgico de la amígdala no solamente participa en el estrés y la ansiedad, también parece estar involucrado en cambios metabólicos del organismo como en la restricción alimentaria.

La expresión de CRH-R2 en la amígdala aumentó tanto en la RA como en la ANX. Estos resultados sugieren que este receptor en la amígdala es regulable en situaciones de desnutrición energético-proteica, y podría estar involucrado en la conducta alimentaria; sin embargo los cambios no son específicos de la anorexia.

Se ha reportado que el CRH-R2 es regulado de manera diferencial dependiendo de la región cerebral estudiada. En un paradigma de estrés fisiológico/psicológico, la separación de las crías de sus madres, disminuyen los niveles del RNAm de CRH-R2 en la amígdala basolateral, y después de la administración de una fórmula láctea, la expresión de este receptor aumenta por arriba de los valores basales (Eghbal-Ahmadi et al., 1999).

Aunque no podemos descartar que además de participar en la conducta alimentaria como se ha propuesto, pudiera estar participando en alteraciones emocionales relacionadas con la anorexia y la desnutrición, como la depresión. En un modelo de deprivación materna, la expresión de CRH-R2 disminuye en la amígdala, y la administración de un antidepresivo tricíclico, desipramina, aumenta la expresión del receptor por arriba de los valores basales (Vázquez et al., 2003).

En la RA aumentó la expresión de GR, mientras que en la ANX no cambió. Se ha propuesto que la activación de GR en la amígdala participa en la memoria a largo plazo (Donley et al., 2005). Por ejemplo en un paradigma de memoria y aprendizaje (Morris water-maze), aumentan los niveles del RNAm de GR en la amígdala (Sánchez et al., 2005). En el aumento en la síntesis de GR en la RA podría deberse a que hubo una mayor actividad de las neuronas de GR para participar en la memoria relacionada al alimento.

Estos resultados sugieren una participación del sistema TRHérgico y CRHérgico de la amígdala en el control de la conducta alimentaria.

NÚCLEO ACCUMBENS

En la RA y la ANX aumentó la expresión de pro-TRH, mientras que la expresión del TRH-R1 solamente cambió en la anorexia, aumentando su expresión. En estudios previos se ha reportado que en ratas de 28 días de edad sometidas a un ayuno por 48 horas (de Gortari et al., 2000), en la restricción alimentaria y en la anorexia inducida por deshidratación durante 7 días en ratas adultas (Jaimes et al., 2003), disminuye el contenido del TRH en el núcleo accumbens. Estos resultados sugieren una activación de las neuronas TRHérgicas lo que lleva a una mayor síntesis y liberación del péptido (Joseph-Bravo et al., 1998). Además, indican que esta activación neuronal no es específica a la anorexia, ya que también se da en la RA.

Se ha demostrado que existen proyecciones axónicas dentro del mismo accumbens entre el “shell” y el “core” del núcleo accumbens (van Dongen y cols., 2005).

No se encontraron cambios en la expresión de TRH-R2 en el núcleo accumbens, estos datos solamente muestran que no se regula la expresión de este receptor en estos modelos de conducta alimentaria.

En cuanto al sistema CRHérgico tanto en la RA como en la ANX disminuyó la expresión de CRH, y la de GR no cambió. Estos resultados indican que la regulación en la expresión de CRH es resultado de la restricción calórica, y que no es específico a la anorexia. El CRH en la RA y la ANX podría estar participando en el hedonismo. Existe evidencia de que las neuronas CRHérgicas del núcleo accumbens participan en el reforzamiento y en la recompensa al consumo de drogas y de alimentos con un alto contenido de azúcares o grasas. El CRH aumenta la transmisión dopaminérgica en esta estructura (Pan et al., 1995; Gurskovskaya et al., 2005), la cual está involucrada en la recompensa y reforzamiento relacionado al consumo del alimento. Además, las neuronas dopaminérgicas expresan receptores a GC. La administración periférica de corticosterona (similar a los niveles circulantes inducidos por el estrés) a ratas estimula la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Piazza et al., 1996).

HIPOCAMPO

En la RA, la expresión del TRH aumentó y la expresión del TRH-R1 disminuyó. En un estudio previo encontramos que en las ratas adultas con restricción alimentaria durante 7 días (Jaimes 2003), y en ratas de 28 días de edad en ayuno durante 48 horas (de Gortari et al., 2000) aumenta el contenido del TRH en el hipocampo. Estos resultados sugieren una activación de las neuronas TRHérgicas (de Gortari et al., 1995, 1998) en la RA. Se sabe que existe comunicación interhipocampal (Afifi y Bergman; 2005).

En cambio en la ANX no se encontró esta activación de la vía TRHérgica. La expresión del TRH y del TRH-R1 no cambió, y tampoco cambió el contenido del TRH en un estudio previo (Jaimes, 2003).

Estudios farmacológicos y conductuales han sugerido una participación del TRH en procesos de memoria y aprendizaje (Horita, 1998; Sánchez et al., en prensa). Después de la restricción calórica y de la desnutrición se presenta una disfunción cognitiva y de memoria (Pollit 1996). Se sugiere que en la RA el sistema TRHérgico se activó mediando el proceso de aprendizaje en relación al alimento. Esto es consistente con datos que indican que las neuronas TRHérgicas del hipocampo se activan en un paradigma de aprendizaje (Morris Water-Maze), en donde aumenta la expresión del TRH (Sánchez et al., en prensa).

La expresión de CRH en la RA y la ANX no cambió, esto podría deberse a una adaptación de las neuronas CRHérgicas al estrés crónico como sucede con GR en el hipocampo (Paskitti et al., 2000).

Se ha reportado que algunos paradigmas de estrés agudo como el estrés por inmovilización disminuyen los niveles del RNAm de GR en el hipocampo (Paskitti et al., 2000; Herman et al., 1995). Sin embargo, en la RA y en la ANX a pesar de que la concentración de corticosterona aumentó, la expresión de GR no cambió. Estos resultados son similares a los reportados por Watts y cols. (2001), donde observan que en el ayuno por 2 y 4 días no cambian los niveles del RNAm de GR. En otros

modelos de estrés crónico intermitente durante 15 (Herman et al., 1999) y 30 días (Herman y Spencer, 1998) tampoco se observan cambios en la expresión de GR en el hipocampo.

Estos resultados sugieren que en el estrés agudo sí se observa una disminución de los niveles de GR, pero no en el estrés crónico como en la RA y la ANX. La falta de regulación en la expresión de GR puede deberse a una adaptación de la síntesis del receptor (Holmes et al., 1995) al estrés. Dos horas después de someter las ratas a un estrés agudo (estrés por inmovilización durante 30min) disminuyen los niveles del RNAm de GR en el hipocampo, y regresan a valores basales a las 4 horas a pesar de que la concentración de corticosterona sigue aumentada (Paskitti et al., 2000).

CORTEZA FRONTAL

En la RA, la expresión del TRH no cambió y la del TRH-R1 disminuyó, mientras que en la ANX la expresión del TRH disminuyó y la de TRH-R1 no cambió. En un estudio previo encontramos que en la restricción alimentaria y en la anorexia inducida por deshidratación durante 7 días disminuye el contenido del TRH en la corteza frontal (Jaimes et al., 2003). No podemos afirmar que hubiera una liberación del péptido en la RA ya que no encontramos cambios en los niveles del RNAm.

La expresión del TRH-R2 no cambió en la RA ni en la ANX, estos datos solamente muestran que no se reguló la expresión del receptor en estos paradigmas.

En la RA y la ANX no cambió la expresión de GR. Ratones transgénicos que tienen una acción disminuida de GR, en la corteza frontal presentan alteraciones en las funciones cognitivas (Montkowski et al., 1995). Este mecanismo podría estar participando en la disminución de las funciones cognitivas relacionadas a la desnutrición.

CORTEZA INSULAR

En el sistema TRHérgico solamente se encontraron diferencias entre la RA y la ANX, donde la expresión del TRH-R1 aumentó con respecto a la RA. Hemos encontrado que en la RA el contenido del TRH disminuye lo que podría significar una liberación del péptido, mientras que en la ANX aumenta el contenido del TRH (Jaimes, 2003). Adicionalmente, anteriormente encontramos que las neuronas TRHérgicas responden a la detección de sabores, ya que el consumo de una solución salina y de una solución de glucosa durante 7 días aumenta de igual manera el contenido de TRH en esta estructura (Jaimes, 2003).

VIII. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

- A pesar de que se presentaron en la RA y la ANX los mismos cambios metabólicos (disminución de la concentración de leptina y aumento de la concentración de corticosterona), y una disminución en el consumo de alimento, el eje HHT en la ANX no presentó la misma adaptación que en la RA.
- Los cambios en el metabolismo de TRH en el Sistema límbico sugieren la participación de este neuropéptido en la anorexia por deshidratación.
- En el NPV del hipotálamo se encontró una regulación diferencial de TRH y CRH-R2 entre la RA y la AN, sugiriendo que este receptor podría estar participando en algún aspecto de la conducta alimentaria en la anorexia y que uno de los posibles blancos de acción de CRH del hipotálamo lateral sea TRH.

Se propone definir en qué momento del desarrollo de la anorexia aparecen los cambios en la vía TRHérgica (proTRH RNAm y TRH-R1 RNAm) y CRHérgica (proCRH RNAm, CRH-R2 RNAm y CRH-R1 RNAm) por RT-PCR, para evaluar si los cambios son una consecuencia del estado metabólico ó pudieran participar en la patología.

También se propone estudiar si las neuronas TRHérgicas en la ANX responden o no al estrés por frío, estímulo que induce una activación de las neuronas TRHérgicas (aumenta la síntesis y liberación hipotalámico del TRH).

Además, se propone definir que células de TRH del NPV (parvocelulares hipofisiotrópicas o, del NPV anterior) y qué núcleos de la amígdala, están modificadas en la AN vs la RA, por hibridación in situ.

Para identificar la participación de CRH y sus receptores CRH-R1 y 2 como posibles responsables de los cambios en la vía TRHérgica del NPV, se propone inyectar antagonistas de CRH-R2 en esta estructura y observar qué cambios se presentan en la anorexia por deshidratación.

IX. REFERENCIAS

- Aceves** C, Escobar C, Rojas-Huidobro R, Vazquez-Martinez O, Martinez-Merlos T, Aguilar-Roblero R, Diaz-Munoz M. Liver 5'-deiodinase activity is modified in rats under restricted feeding schedules: evidence for post-translational regulation. *J Endocrinol* 2003; 179(1):91-96.
- Adam** CL, Mercer JG. Appetite regulation and seasonality: implications for obesity. *Proc Nutr Soc* 2004;63(3):413-419.
- Afifi** AK, Bergman RA. *Functional neuroanatomy*. Ed. Mc Graw Hill, USA 2005, 2a edición.
- Ahima** RS, Prabakaran D, Mantzoros C y cols. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382:250-252.
- Alkemade** A, Unmehopa UA, Wiersinga WM, Swaab DF, Fliers E. Glucocorticoids decrease thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(1):323-327.
- Arancibia** S, Tapia-Arancibia L, Astier H, Assenmacher I. Physiological evidence for α 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci Lett* 1989; 100:169-174.
- Arancibia** S, Tapia-Arancibia S, Assenmacher I. Neuroendocrine and autonomous mechanism underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* 1996; 64:257-267.
- Arborelius** L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* 1999; 160(1):1-12.
- Arch** JR. Central regulation of energy balance: inputs, outputs and leptin resistance. *Proc Nutr Soc* 2005;64(1):39-46.
- Arvaniti** K, Huang Q, Richard D. Effects of leptin and corticosterone on the expression of corticotropin-releasing hormone, agouti-related protein, and proopiomelanocortin in the brain of ob/ob mouse. *Neuroendocrinology* 2001; 73(4):227-236.
- Bali** B, Kovacs KJ. GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 2003; 18(6):1518-1526.

Ballauff A, Ziegler A, Emons G, Sturm G, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain. *Mol Psychiatry* 1999; 4(1):71-75.

Bamshad M, Aoki VT, Adkison MG, Warren WS, Bartness TJ. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *Am J Physiol* 1998; 275(1 Pt 2):R291-299.

Bannai C, Kuzuya N, Koide Y, Fujita T, Itakura M, Kawai K, Yamashita K. Assessment of the relationship between serum thyroid hormone levels and peripheral metabolism in patients with anorexia nervosa. *Endocrinol Jpn.* 1988 ; 35(3):455-462.

Baranowska B, Wolinska-Witort E, Wasilewska-Dziubinska E, Roguski K, Martynska L, Chmielowska M. The role of neuropeptides in the disturbed control of appetite and hormone secretion in eating disorders. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24(6):431-434.

Barofsky AL. Taylor J, Massari VJ. Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology* 1983; 113:1894-1903.

Bartness TJ, Bamshad M. Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol* 1998; 275(5 Pt 2):R1399-1411.

Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing ectoenzyme. *Eur J Biochem* 1994; 224:387-396.

Bellinger LL, Bernardis LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav* 2002; 76(3):431-442.

Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 28:309-369.

Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26(4):393-428.

Bhatnagar S, Sun LM, Raber J, Maren S, Julius D, Dallman MF. Changes in anxiety-related behaviors and hypothalamic-pituitary-adrenal activity in mice lacking the 5-HT-3A receptor. *Physiol Behav* 2004; 81(4):545-555.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon J-L, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno -and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* 1992; 319:218-245.

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

Blüher S, Mantzoros CS. The Role of Leptin in Regulating Neuroendocrine Function in Humans. *J Nutr* 2004; 134:2469S-2474S.

Boler J, Enzmann K, Bowers CY, Schally AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline-amide. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 37:705-710.

Boschi G, Rips R. Effects of thyrotropin-releasing hormone injections into different loci of rat brain on core temperature. *Nurosci Lett* 1981; 23:93-98.

Bowers CY, Friesen HG, Hwang P, Guyda HJ, Folkers K. Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl prolinamide. *Biochem Res Commun* 1971; 45:1033-1041.

Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 1990; 52:441-447.

Burgus R, Dunn T, Desiderio D, Guillemin R. Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d'origine ovine: mise en évidence par spectrometrie de masse de la sequence PCA-His-Pro-NH₂. *CR Acad Sci (Paris)* 1969; 269:1870-1873.

Calzá L, Giardino L, Ceccatelli S, Zanni M, Elde R, Hokfelt T. Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 1992; 51(4):891-909.

Calogero AE, Gallucci WT, Chrousos GP, Gold PW. Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res* 1988; 463(1):28-36.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26: 321-352.

Carelli RM, Ijames SG. Nucleus accumbens cell firing during maintenance, extinction, and reinstatement of cocaine self-administration behavior in rats. *Brain Res.* 2000; 866(1-2): 44-54.

Ceccatelli S, Cintra A, Hokfelt T, Fuxe K, Wikstrom AC, Gustafsson JA. Coexistence of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity with neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Exp Brain Res* 1989; 78(1):33-42.

Chan O, Inouye K, Riddel MC, Vranic M, Matthews SG. Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Minerva Endocrinol.* 2003; 28(2):87-102.

Chan JL, Mantzoros CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa. *Lancet* 2005; 366(9479):74-85.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-Step Method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162:156-159.

Chrousos GP, Kino T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE.* 2005; 304:pe48.

Ciosek J. Vasopressin and oxytocin release as influenced by thyrotropin-releasing hormone in euhydrated and dehydrated rats. *J Physiol Pharmacol* 2002; 53(3):423-437.

Ciosek J, Drobnik J. Vasopressin and oxytocin release and the thyroid function. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Jun; 55(2):423-441.

Clifton PG, Vickers SP, Somerville EM. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behav Neurosci* 1998; 112:502-511.

Cook LB, Hinkle PM. Fate of internalized thyrotropin-releasing hormone receptors monitored with a timer fusion protein. *Endocrinology.* 2004; 145(7):3095-3100.

Collin A, Cassy S, Buyse J, Decuypere E, Damon M. Potential involvement of mammalian and avian uncoupling proteins in the thermogenic effect of thyroid hormones. *Domest Anim Endocrinol.* 2005; 29(1):78-87.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes and Relat Metab Disord* 2001; 25 Suppl 5:S63-S67.

- Critchley** HD, Mathias CJ, Dolan RJ. Fear conditioning in humans: the influence of awareness and autonomic arousal on functional neuroanatomy. *Neuron* 2002; 33(4):653-663.
- Cruz** C, Charli JL, Vargas MA, Joseph-Bravo P. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem* 1991; 56(5):1594-1601.
- Cullen** MJ, Ling N, Foster AC, Pellemounter MA. Urocortin, corticotropin releasing factor-2 receptors and energy balance. *Endocrinology* 2001; 142(3):992-999.
- Cullinan** WE. GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. *J Comp Neurol.* 2000; 419(3):344-351.
- Dahl** GE, Evans NP, Thrun LA, Karsch F. A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 1994; 135(6):2392-2397.
- Danielson** PE, Forss-Petter S, Brow MA, Calavetta L, Douglass J, Milner RJ, Sutcliffe JG. p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 1988; 7(4):261-267.
- Dallman** MF, Akana SF, Bhatnagar S, Bell ME, Choi S, Chu A, Horsley C, Levin N, Meijer O, Soriano LR, Strack AM, Viau V. Starvation: early signals, sensors, and sequelae. *Endocrinology* 1999; 140:4015-4023.
- De Gortari** P, González-Alzati ME, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Effect of fasting on the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nutr Neurosci* 2000; 3:255-265.
- De Gortari** P, Cisneros M, Medellín MA, Joseph-Bravo P. Chronic ingestion of ethanol or glucose solutions affects hypothalamic and limbic TRH metabolism in dams and their pups. *Neurochem Int* 2002; 41:237-249.
- de Gortari** P, Uribe RM, Garcia-Vazquez A, Aguilar-Valles A, Martinez A, Valdes A, Charli JL, Fernandez-Guardiola A, Joseph-Bravo P. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem Int.* 2005, en prensa.
- de Kloet** ER, Oitzl MS, Joels M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?. *Trends Neurosci* 1999; 22(10):422-426.
- de Kloet** ER. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul* 2003 ;37(2): 51-68.

de la Pena P, Delgado LM, del Camino D, Barros F. Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 1992; 284 (PT 3):891-899.

De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA, Labrei F. Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* 1977; 100:1496-1504.

Deussing JM, Wurst W. Dissecting the genetic effect of the CRH system on anxiety and stress-related behavior. *C R Biol* 2005; 328(2):199-212.

De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 1995; 20(8):789-819.

Diorio D, Viau V, Meaney MJ. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 1993; 13(9):3839-3847.

Dolan RJ, Bench CJ, Brown RG, Scott LC, Frackowiak RS. Neuropsychological dysfunction in depression: the relationship to regional cerebral blood flow. *Psychol Med* 1994;24(4): 849-857.

Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol Endocrinol.* 1988; 2(12):1256-1264.

Donley MP, Schulkin J, Rosen JB. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav Brain Res* 2005; 164(2):197-205.

Douglas AJ, Russel JA. Corticotrophin-releasing hormone, proenkephalin A and oxytocin mRNA's in the paraventricular nucleus during pregnancy and parturition in the rat. *Gene Ther* 1994; 1(Suppl 1):S85.

Douyon L, Schteingart DE. Effect of obesity and starvation on thyroid hormone, growth hormone, and cortisol secretion. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2002; 31(1):173-189.

Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature.* 1997 24; 386(6627):824-827.

Duclos M, Timofeeva E, Michel C, Richard D. Corticosterone-dependent metabolic and neuroendocrine abnormalities in obese Zucker rats in relation to feeding. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 288(1):E254-266.

Eghbal-Ahmadi M, Avishai-Eliner S, Hatalski CG, Baram TZ. Differential regulation of the expression of corticotropin-releasing factor receptor type 2 (CRF2) in hypothalamus and amygdala of the immature rat by sensory input and food intake. *J Neurosci* 1999; 19(10):3982-3991.

Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;97(2):61-73.

Eckert E, Pomeroy C, Raymond N, Kohler PF, Thuras P, Bowers CY. Leptin in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(3):791-795.

Fekete C, Legradi G, Mihaly e, Tatro JB, Rand WM, Lechan RM. Alpha-melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 2000; 289(2):152-156.

Fekete C, Singru PS, Sanchez E, Sarkar S, Christoffolete MA, Riberio RS, Rand WM, Emerson CH, Bianco AC, Lechan RM. Differential Effects of Central Leptin, Insulin or Glucose Administration During Fasting on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis and Feeding-Related Neurons in the Arcuate Nucleus. *Endocrinology* 2005, en prensa.

Fenoglio KA, Brunson KL, Avishai-Eliner S, Chen Y, Baram TZ. Region-specific onset of handling-induced changes in corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor expression. *Endocrinology* 2004;145(6):2702-2706.

Fetissov SO, Harro J, Jaanisk M, Jarv A, Podar I, Allik J, Nilsson I, Sakthivel P, Lefvert AK, Hokfelt T. Autoantibodies against neuropeptides are associated with psychological traits in eating disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(41):14865-14870.

Fischer WH, Spiess J. Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(11):3628-3632.

Fjeldheim A-K, Hovring PI, Loseth O-P, Johansen PW, Glover JC, Matre V, Olstand OK, Reppe S, Gordeladze JO, Walaas SI, Gautvik KM. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1 and prothyrotrophin-releasing hormone mRNA expression in the central nervous system are regulated by suckling in lactating rats. *Eur J Endocrinol* 2005; 152:791-803.

Flier JS, Harris M, Hollenberg A. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J Clin Invest* 2000; 105(7):859-861.

Foulkes NS, Laoide BM, Schlotter F, Sassone-Corsi P. Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates c-fos cAMP-induced expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 ; 88(12):5448-5452.

Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 2000; 130:3127S-3131S.

Friedman TC, Yanovski JA, Jayasvasti V, Yanovski SZ, Koenig RJ, Wilk S. Pyroglutamyl peptidase-II ("Thyroliberinase") activity in human serum: influence of weight and thyroid status. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(4):1086-1089.

Frim DM, Robinson BG, Pasiaka KB, Majzoub JA. Differential regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in rat brain. *Am J Physiol.* 1990; 258(4 Pt 1):E686-692.

Fukuda M, Ono T. Amygdala-hypothalamic control of feeding behavior in monkey: single cell responses before and after reversible blockade of temporal cortex or amygdala projections. *Behav Brain Res.* 1993; 55(2):233-241.

Furmark T, Fischer H, Wik G, Larsson M, Fredrikson M. The amygdala and individual differences in human fear conditioning. *Neuroreport* 1997; 8(18):3957-3960.

Gershengorn MC. Bihormonal regulation of the thyrotropin-releasing hormone receptor in mouse pituitary thyrotropic tumor cells in culture. *J Clin Invest* 1978; 62:937-943.

Gershengorn MC, Marcus-Samuels BE, Geras E. Estrogens increase the number of thyrotropin-releasing hormone receptors on mammatropic cells in culture. *Endocrinology*, 1979; 105:171-176.

Gershengorn MC, Osman R. Molecular and cell biology of thyrotropin releasing hormone receptors. *Physiol Rev* 1996; 76:175-191.

Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, Spencer RL. Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotropin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 2003; 15(11):1075-83.

Gold PW, Gwirtsman H, Avgerinos PC y cols. Abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal function in anorexia nervosa: Pathophysiologic mechanisms in underweight and weight-corrected patients. *N Engl J Med* 1986; 314:1335.

Gottfried JA, O'Doherty J, Dolan RJ. Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. *Science* 2003; 301(5636):1104-1107.

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

Guo F, Bakal K, Minokoshi Y, Anthony N. Leptin signaling targets the Thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 2004; 145(5):2221-2227.

Gurkovskaya OV, Palamarchouk V, Smagin G, Goeders NE. Effects of corticotropin-releasing hormone receptor antagonists on cocaine-induced dopamine overflow in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of rats. *Synapse* 2005; 57(4):202-212.

Gutiérrez M. Participación de la hormona liberadora de tirotrópina en la ansiedad. Estudio preliminar a partir del modelo de enterramiento defensivo. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México; 2002.

Gutiérrez M. Participación de la hormona liberadora de tirotrópina en la conducta de ansiedad. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México; 2005.

Haas V, Onur S, Paul T, Nutzinger DO, Bosy-Westphal A, Hauer M, Brabant G, Klein H, Muller MJ. Leptin and body weight regulation in patients with anorexia nervosa before and during weight recovery. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(4):889-896.

Harris M, Aschkenasi C, Elias CF y cols. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.* 2001; 107:111- **Hatalski CG**, Guirguis C, Baram TZ. Corticotropin releasing factor mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central nucleus of the amygdala is modulated by repeated acute stress in the immature rat. *J Neuroendocrinol* 1998; 10(9):663-669.

120.

Hebebrand J, Blum WF, Barth N, Coners H, Englaro P, Juul A, Ziegler A, Warnke A, Rascher W, Remschmidt H. Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Mol Psychiatry* 1997; 2(4):330-334.

Heinrichs SC, Lapsansky J, Lovenberg TW, De Souza EB, Chalmers DT. Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. *Regul Pept* 1997;71(1):15-21.

Heinrichs SC, Richard D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 1999; 33(5):350-359.

Herman JP, Adams D, Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*. 1995; 61(2):180-190.

Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997; 20(2):78-84.

Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 2003; 24(3):151-180.

Heuer H, Ehrchen J, Bauer K, Schafer MK. Region-specific expression of thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur J Neurosci*. 1998; 10(4):1465-1478.

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

Heuer H, Schäfer MK-H, O'Donnell D, Walker P, Bauer K. Expression of thyrotrophin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* 2000; 428:319-336.

Hillhouse EW, Milton NG. Effect of noradrenaline and gamma-aminobutyric acid on the secretion of corticotrophin-releasing factor-41 and arginine vasopressin from the rat hypothalamus in vitro. *J Endocrinol* 1989 ; 122(3):719-723.

Hinkle PM, Pekary AE, Senanayaki S, Sattin A. Role of TRH receptors as possible mediators of analeptic actions of TRH like peptides. *Brain Res*. 2002; 935(1-2):59-64.

Huang Q, Rivest R, Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob)mice. *Endocrinology* 1998; 139(4):1524-1532.

Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* 1995; 9:540-550.

Holtkamp K, Hebebrand J, Herpertz-Dahlman B. The contribution of anxiety and food restriction on physical activity levels in acute anorexia nervosa. *Int J Eat Disord* 2004; 36(2):163-171.

Holtkamp K, Muller B, Heussen N, Remschmidt H, Herpertz-Dahlman B. Depression, anxiety, and obsessionality in long-term recovered patients with adolescent-onset anorexia nervosa. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2005; 14(2):106-110.

Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci* 1998; 62:1443-1448.

Horvath TL, Diano S, Tscöp M. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist* 2004; 10(3):235-246.

Hotta M, Shibasaki T, Masuda A y cols. The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone(CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62:319-324.

Hukshorn CJ, Saris WH. Leptin and energy expenditure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7(6):629-633.

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

Imaki T, Naruse M, Harada S, Chikada N, Imaki J, Onodera H, Demura H, Vale W. Corticotropin-releasing factor up-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*.1996; 38(1): 166-170.

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

Jaimes L. Metabolismo de la hormona liberadora de tirotrópina en modelos animales de anorexia y restricción alimentaria en regiones del sistema límbico. Tesis de Licenciatura, Escuela de Dietética y Nutrición 2003.

Jaimes L, Cabrera-Wrooman A, Vilches A, Guzmán C, Camacho-Arroyo I. Péptidos Anorexigénicos y su participación en la conducta alimentaria. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 2005; 13(2):67-74.

Jéquier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* 1999; 79:451-480.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Oct 11;102(41):14865-70.

Jimerson DC, Wolfe BE. Neuropeptides in eating disorders. *CNS Spectr* 2004; 9(7):516-522.

Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargar MA, Pérez-Martínez L, Zoeller T. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(2):231-247.

JingamiH, Mizuno N, Takahashi H, Shibahara S, Furutani Y, Imura H, Numa S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat corticotropin-releasing factor precursor. *FEBS Lett* 1985; 191 (1):63-66.

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

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

Kaye WH. Neuropeptide abnormalities in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 1996;62: 65-74.

Keel PK, Klump KL, Miller KB, McGue M, Iacano WG. Shared transmission of eating disorders and anxiety disorders. *Int J Eat Disord* 2005; 38(2):99-105.

Kim MS, Small CJ, Stanley SA y cols. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest* 2000; 105:1005-1011.

King BM, Cook JT, Rossiter KN, Theobald LM, Sam H. Posterodorsal amygdaloid lesions in rats: long-term effects on body weight. *Physiol Behav* 1996; 60(6):1569-1571.

Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 2004;55(1 Pt 2):137-154.

Kumar R, Thompson EB. Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94(5):383-394.

Laugero KD, Bell ME, Bhatnagar S, Soriano L, Dallman MF. Sucrose ingestion normalizes central expression of corticotropin-releasing-factor messenger ribonucleic acid and energy balance in adrenalectomized rats: a glucocorticoid-metabolic-brain axis?. *Endocrinology* 2001; 142: 2796-2804.

Lechan RM, Jackson MD. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 1982; 111(1): 55-65.

Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolfe H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 1986a; 231:159-161.

Lechan RM, Wu P, Jackson IMD. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 1986b; 119: 1210-1216.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 2000; 23:155-184.

Lee SL, Stewart K, Goodman R. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* 1988; 263:16604-16609.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing-hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997; 138:2569-2576.

Leibel R, Rosenbaum M. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* 1995; 332:621-628.

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

Lesem MD, Kaye WH, Bissette G, Jimerson DC, Nemeroff CB. Cerebrospinal fluid TRH immunoreactivity in anorexia nervosa. *Biol Psychiatry* 1994; 35:48-53.

Leslie RD, Isaacs AJ, Gomez J, Raggatt PR, Bayliss R. Hypothalamo-pituitary-thyroid function in anorexia nervosa: influence of weight gain. *Br Med J* 1978 19; 2(6136):526-528.

Licino J, Wong ML, Godl PW. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis in anorexia nervosa. *Psychiatry Res* 1996; 62(1):75-83.

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

Lindblom J, Haitina T, Fredriksson R, Schiöth HB. Differential regulation of nuclear receptors, neuropeptides and peptide hormones in the hypothalamus and pituitary of food restricted rats. *Mol Brain Res* 2005; 133: 37-46.

Liu JL, Patel YC. Glucocorticoids inhibit somatostatin gene expression through accelerated degradation of somatostatin messenger ribonucleic acid in human thyroid medullary carcinoma (TT) cells. *Endocrinology* 1995; 136:2389-2396.

Lloyd RL, Pekary AE, Satin A, Amundson T. Antidepressant effects of thyrotropin-releasing hormone analogues using a rodent model of depression. *Pharmacol, Biochem Beba* 2001; 70:15-22.

Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995; 92 (3):836-840.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 2000; 404(6778):652-660.

Lu X-Y, Barsh GS, Akil H, Watson SJ. Interaction between α -Melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 2003; 23(21):7863-7872.

Luo X, Kiss A, Rabadan-Diehl C, Aguilera G. Regulation of hypothalamic and pituitary corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid by adrenalectomy and glucocorticoids. *Endocrinology* 1995; 136(9):3877-3883.

Ma XM, Aguilera G. Differential regulation of corticotropin-releasing hormone and vasopressin transcription by glucocorticoids. *Endocrinology* 1999; 140(12):5642-50.

Makino S, Gold PW, Schulkin J. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* 1994; 640(1-2):105-112.

Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* 1995;136(10):4517-4525.

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

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

Makino S, Shibasaki T, Yamauchi N, Nishioka T, Mimoto T, Wakabayashi I, Gold PW, Hashimoto K. Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res* 1999; 850(1-2):136-143.

Makino S, Kaneda T, Nishiyama M, Asaba K, Hashimoto K. Lack of decrease in hypothalamic and hippocampal glucocorticoid receptor mRNA during starvation. *Neuroendocrinology* 2001; 74(2):120-128.

Malendowicz LK, Spinazzi R, Nowak KW, Nussdorfer GG, Majchrzak M. Effects of arginine vasopressin (AVP) on the pituitary-thyroid axis in the rat: Evidence that endogenous AVP, acting via V1 receptors, lowers TSH blood concentration. *Int J Mol Med*. 2004 ; 13(6):869-872.

Mantzoros C, Flier J, Lesem MD, Brewerton T, Jimerson D. Cerebrospinal fluid leptin in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to weight gain. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6):1845-1851.

Masaki T, Yishimichi G, Chiba S, yasuda T, Noguehi H, Kakuma T, et al. Corticotropin-releasing hormone-mediated pathway of leptin to regulate feeding, adiposity, and uncoupling protein expression in mice. *Endocrinology* 2003; 144 (78):3547-3554.

Mastorakos G, Zapanti E. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neuroendocrine regulation of food intake and obesity: the role of corticotropin releasing hormone. *Nutr Neurosci* 2004; 7(5-6):271-280.

Matre V, Karlsen HE, Wright MS y cols. Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor. *Biochem. Biophys Res Commun* 1993; 195:179-185.

Méndez 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; 8(2): 291-298.

Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D, Anisman H. Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci* 1998; 18(12):4758-4766.

Miesfeld R, Rusconi S, Godowski PJ, Maler BA, Okret S, Wikstrom AC, Gustafsson JA, Yamamoto KR. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 1986; 46 (3): 389-399.

Mihály E, Fekete C, Legradi G, Lechan RM. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res* 2001; 891(1-2):20-31.

Mitsuma T, Rhue N, Kayama M y cols. Distribution of thyrotropin releasing hormone receptor type 2 in rats: an immunohistochemical study. *Endocrine Regul* 1999; 33:135-139.

Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2001; 26(5):443-459.

Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 2003; 119(3):887-897.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P. Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 1993; 75(5):875-886.

Momose K, Inui A, Asakawa A, Ueno N, Nakajima M, Fujimiya M, Kasuga M. Intracerebroventricularly administered corticotropin-releasing factor inhibits food intake and produces anxiety-like behaviour at very low doses in mice. *Diabetes Obes Metab*. 1999; 1(5):281-284.

Montkowski A, Barden N, Wotjak C, Stec I, Ganster J, Meaney M, Engelmann M, Reul JM, Landgraf R, Holsboer F. Long-term antidepressant treatment reduces behavioural deficits in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J Neuroendocrinol* 1995; 7(11):841-845.

Morris JS, Dolan RJ. Involvement of human amygdala and orbitofrontal cortex in hunger-enhanced memory for food stimuli. *J Neurosci* 2001; 21(14):5304-5310.

Narayanan CS, Fujimoto F, Geras-Raaka E, Gershengorn MC. Regulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) of TRH receptor mRNA degradation in rat pituitary GH3 cells. *J Biol Chem* 1992; 267:17296-17303.

Nilni EA, Friedman TC, Todd RB, Birch NP, Loh YP, Jackson IMD. Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *J. Neurochem.* 1995; 65:2462-2472.

Nilni EA, Leiter EH, Wetsel WC. The mutation in carboxypeptidase E (CPE) in the fat/fat mouse is associated with a defect in processing the prohormone for thyrotropin-releasing hormone (TRH) en Program of the 79th Annual Meeting of The Endocrine Society, Minneapolis, MN, 1997:203.

Nilni E, Sevarino K. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev* 1999; 20(5):599-648.

Nilni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjørbaek, Flier J. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem* 2000; 275(46):36124-36133.

Nishiyama M, Makino S, Asaba K, Hashimoto K. Leptin effects on the expression of type-2 CRH receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* 1999; 11(4):307-314.

O'Dowd BF, Lee DK, Nguyen T, Gheng R, Liu Y, Wang B, Gershengorn MC, George SR. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol Endocrinol* 2000; 14:183-193.

Ogawa H, Ito S, Murayama N, Hasegawa K. Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neurosci Res* 1990; 9(3):196-201.

Ogawa S, Tank DW, Menon R, Ellermann JM, Kim SG, Merkle H, Ugurbil K. Intrinsic signal changes accompanying sensory stimulation: functional brain mapping with magnetic resonance imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(13):5951-5955.

Okret S, Poellinger L, Dong Y, Gustafsson JA. Down-regulation of glucocorticoid receptor mRNA by glucocorticoid hormones and recognition by the receptor of a specific binding sequence within a receptor cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(16):5899-5903.

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK y cols. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997; 278:135-138.

- O'Mara** BA, Dittrich W, Lauterio TJ, St Germain DL. Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology* 1993; 133(4):1715-1723.
- Onur** S, Haas V, Bosy-Westphal A, Hauer M, Paul T, Nutzinger D, Klein H, Muller MJ. L-triiodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight patients with anorexia nervosa and during weight gain. *Eur J Endocrinol.* 2005; 152(2):179-184.
- Orth** DN. Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endo Rev* 1992; 13(2):164-191.
- Palkovitz** M, Brownstein M. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier, New York, 1988.
- Palkovits** M. Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. *Eur J Pharmacol.* 2000; 405(1-3):161-166.
- Pan** JT, Lookingland KJ, Moore KE. Differential Effects of Corticotropin-Releasing Hormone on Central Dopaminergic and Noradrenergic Neurons. *J Biomed Sci* 1995; 2(1):50-56.
- Plamondon** H, Merali Z. Regulation of ingestion by CRF and bombesin-like peptides: distinct meal-related peptide level changes. *Am J Physiol* 1997; 272(1 Pt 2):R268-R274.
- Ponce** G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988; 48(2):211-213.
- Pratt** WB. Glucocorticoid receptor structure and the initial events in signal transduction. *Prog Clin Biol Res* 1990; 322:119-132.
- Rashid** S, Lewis GF. The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues. *Clin Biochem.* 2005; 38(5):401-409.
- Reul** JM, Bilang A, Droste S, Linthorst AC, Holsboer F, Gesing A. New mode of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation: significance for stress-related disorders. *Z Rheumatol.* 2000; 59 Suppl 2:II/22-5.
- Rooszendaal** B, McGaugh JL. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem* 1996; 65(1):1-8.
- Rooszendaal** B. 1999 Curt P. Richter award. Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology* 2000 ; 25(3):213-238.

Richard D, Lin Q, Tomofeeva E. The corticotropin-releasing factor family of peptides and CRF receptors: their roles in the regulation of energy balance. *Eur J Pharmacol* 2002; 440(2/3):189-197.

Richter K, Kawashima E, Egger R, Kreil G. Biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO J* 1984; 3:617-621.

Rondeel JMM, De Greef WJ, Klootwijk W, Visser TJ. Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 1992; 130(2):651-656.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JRS, Buchingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu W-S, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92_573-585.

Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995; 377:527-529.

Sánchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacharias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P. Differential responses of TRH neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the PVN of rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 2001; 74:407-422.

Sarkar S, Legradi G, Lechan RM. Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 2002; 945(1):50-59.

Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan RM. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 2004;999(2):181-192.

Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* 1982; 257:275-325.

Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 1983; 277:355-360.

Scharrer E. Control of food intake by fatty acid oxidation and ketogenesis. *Nutrition* 1999; 15(9):704-714.

Schaner P, Todd RB, Seidah NG, Nillni EA. Processing of prothyrotropin releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J Biol Chem* 1997; 272:19958-19968.

Schauder B, Schomburg L, Kohrle J, Bauer K. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(20): 9534-9538.

Schomburg L, Bauer K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-Degrading Ectoenzyme. *Endocrinology* 1995; 136(8):3480-3485.

Schmitmeier S, Thole H, Bader A, Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone(TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur J Biochem* 2002; 269(4):1278-1286.

Schwartz MW, Dallman MF, Woods S. Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *Am J Physiol* 1995; 269 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 38): R949-R957.

Seeley RJ, Matson CA, Chavez M, Woods SC, Dallman MF, Schwartz MW. Behavioral endocrine, and hypothalamic responses to involuntary overfeeding. *Am J Physiol* 1996; 271(3Pt2):R819-823.

Servatius RJ, Beck KD, Moldow RL, Salameh G, Tumminello TP, Short KR. A stress-induced anxious state in male rats: corticotropin-releasing hormone induces persistent changes in associative learning and startle reactivity. *Biol Psychiatry* 2005 15; 57(8):865-872.

Sevarino KA, Goodman RH, Spiess J, Jackson MD, Wu P. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor processing. Characterization of mature TRH and non-TRH peptides synthesized by transfected mammalian cells. *J Biol Chem* 1989; 264(36):21529-21535.

Shepard JD, Barron KW, Myers DA. Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Res* 2000; 861(2):288-295.

Shepard JD, Liu Y, Sassone-Corsi P, Aguilera G. Role of glucocorticoids and cAMP-mediated repression in limiting corticotropin-releasing hormone transcription during stress. *J Neurosci* 2005; 25(16):4073-4081.

Silvestri E, Schiavo L, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiol Scand*. 2005;184(4):265-83.

Sivitz WI, Walsh SA, Morgan DA, Thomas MJ, Haynes WG. Effects of leptin on Insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 1997; 138(8):3395-3401.

Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De Souza EB, Harris RB. The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport* 1998; 9(7):1601-1606.

Smagin GN, Heinrichs SC, Dunn AJ. The role of CRH in behavioral responses to stress. *Peptides* 2001; 22(5):713-724.

Smith DF, Toft DO. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 1993; 7:4-11.

Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W, Koob GF. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 1996; 273(5281):1561-1564.

Solinas G, Summermatter S, Mainieri D, Gubler M, Montani JP, Seydoux J, Smith SR, Dulloo AG. Corticotropin-releasing hormone directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle possibly through substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation. *Endocrinology* 2005, en prensa.

Stahl CE, Redei E, Wang Y, Borlongan CV. Behavioral, hormonal and histological stress markers of anxiety-separation in postnatal rats are reduced by prepro-thyrotropin-releasing hormone 178-199: *Neuroscience Letters* 2002; 321:85-89.

Stanley SA, Small CJ, Murphy KG, Rayes E, Abbott CR, Seal LJ, Morgan DG, Sunter D, Dakin CL, Kim MS, Hunter R, Kuhar M, Ghatei MA, Bloom SR. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res* 2001; 893(1-2):186-194.

Steward CA, Horan TL, Schuhler S, Bennett GW, Francis JP. Central administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster. *NeuroReport* 2003; 14(5): 1-5.

Suda T, Tozawa F, Iwai I, Sato Y, Sumitomo T, Nakano Y, Yamada M, Demura H. Neuropeptide Y increases the corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid level in the rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 1993; 18:311–315.

Sun Y, Gershengorn MC. Correlation between basal signaling and internalization of thyrotropin-releasing hormone receptors: evidence for involvement of similar receptor conformations. *Endocrinology*. 2002; 143(8):2886-2892.

Sun Y, Lu X, Gershengorn MC. Thyrotropin-releasing hormone receptors: similarities and differences. *J Mol Endocrinol* 2003;30(2):87-97.

Suzuki S, Solberg LC, Redei EE, Handa RJ. Prepro-thyrotropin releasing hormone 178-199 immunoreactivity is altered in the hypothalamus of the Wistar-Kyoto strain of rat. *Brain Res* 2001; 913:224-233.

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev* 2005; 4(2):141-194.

Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 1983; 6:269-324.

Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW, Rho JH. The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 512:12-23.

Taha SA, Howard LF. Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 2005; 25(5):1193-1202.

Tamai H, Mori K, Matsubayashi S y cols. Hypothalamic-pituitary-thyroidal dysfunction in anorexia nervosa. *Psychother*. 1986; 46(3): 127-131.

Tang R, Man WSY. The regional distribution of TRH, leu-enkephalin, met-enkephalin, substance P, somatostatin and cholecystinin in the rat brain and pituitary. *Neuropeptides* 1991; 19:287-292.

Taylor T, Wondisford RE, Blaine T, Weintraub BD. The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology* 1990; 126:317-324.

Tempel DL, Leibowitz SF. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 1994; 6(9):479-501.

Thompson BL, Erickson K, Schulkin J, Rosen JB. Corticosterone facilitates retention of contextually conditioned fear and increases CRH mRNA expression in the amygdala. *Behav Brain Res* 2004; 149(2):209-215.

Timofeeva E, Huang Qm, Richard D. Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system. *Neuroendocrinology* 2003; 77(6):388-405.

Torres H, Charli JL, González Noriega A, Vargas MA, Joseph-Bravo P. Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin-releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem Int* 1986; 9:103-110.

Tracy AL, Jarrard LE, Davidson TL. The hippocampus and motivation revisited: appetite and activity. *Behav Brain Res* 2001; 127:13-23.

Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407:908-913.

Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endo Inv* 2001; 24:RC19-RC21.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002; 53(4):865-871.

Tso JH, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 1985; 13:2485-2502.

Unikel S, Villatoro V. Conductas alimentarias de riesgo en adolescentes mexicanos. Datos en población estudiantil del Distrito Federal. *Rev Invest Clin (México)*. 2000; 52(2):140-147.

Unikel C, Saucedo-Molina Teresita, Villatoro J, Fleiz C. Conductas alimentarias de riesgo y distribución del índice de masa corporal en estudiantes de 13 a 18 años. *Salud Mental* 2002; 25(2):49-57.

Uribe RM, Redondo, Charli JL, Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increases TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, 1993; 58:140-145.

Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* 1981; 213:1397-1397.

van Dongen YC, Deniau JM, Pennartz CM, Galis-de Graaf Y, Voorn P, Thierry AM, Groenewegen HJ. Anatomical evidence for direct connections between the shell and core subregions of the rat nucleus accumbens. *Neuroscience* 2005; 136(4):1049-1071.

van Haasteren GAC, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JMM, Temen APN, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, Bauer K, Visser TJ, Greef WJ. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *Journal of Endocrinology* 1995; 145:143-153.

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

Vargas MA, Cisneros M, Herrera J, Joseph-Bravo P, Charli JL. Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs. *Peptides*, 1992; 13:255-260.

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

Vargas MA, Uribe RM, Cisneros M, Romero F, Gonzalez S, Joseph-Bravo P, Charli JL. Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohypophysis. *Eur J Endocrinol* 2002; 147(3):363-369.

Vazquez DM, Eskandari R, Phelka A, Lopez JF. Impact of maternal deprivation on brain corticotropin-releasing hormone circuits: prevention of CRH receptor-2 mRNA changes by desipramine treatment. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28(5):898-909.

Vrang N, Larsen PJ, Kristensen P, Tang-Christensen M. Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 2000; 141:794-801.

Walker CD, Tilders FJ, Bulet A. Increased colocalization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in paraventricular neurones of the hypothalamus in lactating rats: evidence from immunotargeted lesions and immunohistochemistry. *J Neuroendocrinol* 2001; 13(1):74-85.

Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y- synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 325:47-51.

Watts A. Dehydration-associated anorexia: development and rapid reversal. *Physiol and Behav* 1998; 65(4-5):871-878.

Watts AG, Sánchez-Watts G, Kelly AB. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J Neurosci* 1999; 19(14):6111-6121.

White N, Jeffcoate SL, Griffiths EC, Hooper KC. Effect of thyroid status on the thyrotrophin releasing hormone-degrading activity of rat serum. *J Endocrinol* 1976; 71(1):13-19.

Wittman G, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-containing axons innervating hypophysiotropic corticotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat. *Endocrinology* 2005; 146(7):2985-2991.

Wolfe BE, Jimerson DC, Orlova C, Mantzoros CS. Effect of dieting on plasma leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in healthy volunteers. *Clin Endocrinol* 2004; 61(3):332-338.

Woods SC. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286(1):G7-13.

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

Yamada M, Radovick S, Wondisford RE, Nakayama Y, Weintraub BD, Wilber JF. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human preprothyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 1990; 4:551-556.

Yanai S, Okaichi Y, Okaichi H. Long-term dietary restriction causes negative effects on cognitive functions in rats. *Neurobiol Aging* 2004; 25(3):325-332.

Yen P. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001; 81(13):1097-1142.

Zhang M, Kelley AE. Intake of saccharin, salt, and ethanol solutions is increased by infusion of a μ opioid agonist into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 159:415-423.

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

Zimmermann-Belsing T, Brabant G, Holst JJ, Feldt-Rasmussen U. Circulating leptin and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol* 2003; 149:257-271.

Zorilla EP, Reinhardt LE, Valdez GR, Inoue K, Rivier JE, Vale WW, Koob GF. Human urocortin 2, a corticotropin-releasing factor (CRF)₂ agonist, and ovine CRF, a CRF agonist, differentially alter feeding and motor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 310(3):1027-1034.

X. ANEXOS

ANEXO 1. Extracción del RNA total por el método de tiocinato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987)

La extracción de RNA se realizó por el método de tiocinato de guanidina (Chomczynski y Sacchi 1987). Para la purificación del RNA, se agrega a los tejidos congelados solución D (4 M de tiocinato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio, 0.5% de sarcosil pH 7, y 0.1 M de β -mercaptoetanol), posteriormente los tejidos fueron homogenizados con un sonicador (Sonics Vibra Cell Ultrasonic Processor). Los volúmenes de solución D utilizados fueron los siguientes: NPV y adenohipófisis, 150 μ l; núcleo accumbens y corteza insular 250 μ l; corteza frontal, amígdala e hipocampo 500 μ l.

Posteriormente se adicionaron las siguientes soluciones agitando con un vórtex después de cada paso: 1/10 del volumen del homogenado de acetato de sodio 2 M pH 4.0, un volumen de fenol saturado en agua y 0.2 del volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1 v/v. Se dejaron las muestras en hielo durante 15 min. en reposo y se centrifugaron a 10000 rpm por 20 min. a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó un volumen de isopropanol. Se guardaron las muestras -20 °C durante toda la noche.

El segundo día se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 30min. a 4 °C; se obtuvo el sobrenadante y se almacenó en otros tubos de centrifugación. Al precipitado se le adicionó 1/3 del volumen inicial del homogenado de solución D y un volumen de isopropanol, se guardaron las muestras una hora a -20 °C; posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm, se obtuvo el sobrenadante y se guardó en otros tubos; al precipitado se le adicionó un volumen de etanol al 75% y se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 12 min. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua, se adicionó 1/20 de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto del volumen de agua. Se almacenaron las muestras a -20 °C durante toda la noche.

El tercer día se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 30 min. a 4 °C; se obtuvo el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en etanol al 75%; se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 12 min. a 4 °C (esto se realizó en total 2 veces), se obtuvo el sobrenadante y el precipitado se secó en el savant durante 5 min. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 30 μ l de agua y se realizó la lectura de las muestras en un espectrofotómetro a 260, 230 y 280 nm. Si la

relación 260/230 de las muestras fue menor de 1.5 se adicionó 1/25 de acetato de sodio más 3 volúmenes de etanol, se almacenaron las muestras a -20°C y se repitieron los pasos del tercer día. Se prepararon alícuotas de $1.5\ \mu\text{g}$ de RNA en $12\ \mu\text{l}$ de agua para realizar más tarde la técnica de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y otras alícuotas de $0.5\ \mu\text{g}$ de RNA en $4\ \mu\text{l}$ de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, inactiva a las RNAsas evitando la degradación del RNA) para verificar más tarde que el RNA no estuviera degradado.

ANEXO 2. Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR)

Se calentaron las alícuotas de RNA en baño maría a 65°C durante 5 min. y posteriormente se colocaron las muestras directamente en hielo. Se adicionó la mezcla de RT a cada tubo: $8.9\ \mu\text{l}$ de agua bidestilada con DEPC, $6.0\ \mu\text{l}$ de buffer RT 5 X ($250\ \text{mM}$ Tris-HCl, $375\ \text{mM}$ KCl, $15\ \text{mM}$ MgCl_2), $3.0\ \mu\text{l}$ de ditioneitol (DTT) $0.1\ \text{M}$ 10 X, $0.6\ \mu\text{l}$ de dNTPs $10\ \text{mM}$, $1.0\ \mu\text{l}$ de oligo dT $0.5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0.5\ \mu\text{l}$ de transcriptasa reversa (M-MLV RT, $200\ \text{u}/\mu\text{l}$). Se incubaron las muestras a 37°C durante 2 horas. Al término de la incubación se tomaron $4\ \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción de cDNA y se adicionó la mezcla de PCR a cada muestra: $33.5\ \mu\text{l}$ de agua bidestilada estéril con DEPC, $5\ \mu\text{l}$ de buffer Taq DNA polimerasa ($5\ \text{u}/\mu\text{l}$) 10 x, $1.0\ \mu\text{l}$ de dNTPs $10\ \text{mM}$, $1.0\ \mu\text{l}$ del correspondiente oligonucleótido sentido, $1.0\ \mu\text{l}$ del oligonucleótido correspondiente antisentido, $1.5\ \mu\text{l}$ de MgCl $1.5\ \text{mM}$ y $0.5\ \mu\text{l}$ de Taq DNA polimerasa $5\ \text{u}/\mu\text{l}$ (Invitrogen, Taq DNA polymerase, recombinant).

Se verificó que el RNA no estuviera degradado, por electroforesis en gel de agarosa al 1% ($0.75\ \text{g}$ de agarosa Standard-Lowm_r, (Biorad), $15\ \text{ml}$ de TBE 5X (buffer) y $45\ \text{ml}$ de agua miliQ estéril). Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient). En la **tabla 1** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos estudiados, así como de los genes controles, y en la **tabla 2** los ciclos y condiciones de amplificación para cada gen y cada región del cerebro estudiada:

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO
TRH Lechan et al., 1986a	(5'-3'): GGACCTTGGTTGCTGTGCGACTCTGGCTTTG	(5'-3'): ATGACTCCTGCTCAGGTCATCTAGAAGCT
TRH-R1 De la Peña et al., 1992	(5'-3'): ACCCAGAGAAGCAGGCAGCGTGACA	(5'-3'): GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG
TRH-R2 Cao et al., 1998	(5'-3'): GTCTTCCTAGTGCTCCTGGTGTG	(5'-3'): CCAGCAAGGGTCCGATGAAAAAG
CRH Jingami et al., 1985	(5'-3'): AGAAGAGAGCGCCCCTAAAC	(5'-3'): ATCAGAATCGGCTGAGGTTG
CRH-R2 Lovenberg et al., 1995	(5'-3'): TTGGCAAGGAACCTGGTGAC	(5'-3'): ACCCAGGGAAGGCTGTGAAG
GR Miesfeld et al., 1986	(5'-3'): TAAATAAGAGGGAGCAAACACTACTGG	(5'-3'): AAAAAGCACATCACACATAAATCTG
PPII Schauder et al., 1994	(5'-3'): GGACACCCAAATAATTGCT	(5'-3'): CTGGATCGCATACAAAAAG
Ciclofilina Danielson et al., 1988	(5'-3'): GGGGAGAAAGGATTTGGCTA	(5'-3'): ACATGCTTGCCATCCAGCC
G3PDH Tso et al., 1985	(5'-3'): CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC	(5'-3'): TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC

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

NPV	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	26
TRH-R1	67	25	29
TRH-R2	67	25	30
CRH	60	25	26
CRH-R2	64	25	31
GR	64	25	27
Ciclofilina y G3PDH	64	50	21
AMIGDALA	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	27
TRH-R1	67	25	29
TRH-R2	67	25	31
CRH	60	25	30
CRH-R2	64	25	34
GR	64	25	24
Ciclofilina y G3PDH	64	50	20 y 22
HIPOCAMPO	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	27
TRH-R1	67	25	28
TRH-R2	67	25	31
CRH	60	25	30
CRH-R2	64	25	31
GR	64	25	24
Ciclofilina y G3PDH	64	50	18 y 23
N.ACCUMBENS	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	29
TRH-R1	67	25	31
TRH-R2	67	25	31
CRH	60	25	30
CRH-R2	64	25	32
GR	64	25	25
Ciclofilina y G3PDH	64	50	21 y 22
C.FRONTAL	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	30
TRH-R1	67	25	29
TRH-R2	67	25	30
CRH	60	25	31
CRH-R2	64	25	31
GR	64	25	25
Ciclofilina y G3PDH	64	50	20 y 21
C.INSULAR	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH	64	25	26
TRH-R1	67	25	29
TRH-R2	67	25	31
CRH-R2	64	25	-
GR	64	25	25
Ciclofilina y G3PDH	64	50	20 y 21
ADENOHIPOFISIS	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH-R1	64	25	26
PPII	55	25	30
GR	64	25	25
Ciclofilina	64	50	20

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

Después de la amplificación de los genes, se realizó una electroforesis para semicuantificar los productos. La ciclofilina se utilizó como gen control de TRH, TRH-R1, TRH-R2, CRH-R2, GR y PPII; se utilizó la ciclofilina en este caso ya que el tamaño del amplificado es diferente a los genes en estudio, permitiendo que las bandas en el gel se separen. El G3PDH se utilizó como gen control de CRH por la misma razón que en el caso de la ciclofilina. Se preparó un gel de agarosa al 2% para todos los amplificados, excepto para CRH, para el cual se preparó un gel de agarosa al 2.5%. Los gels de agarosa se prepararon de la siguiente manera: Para 75 ml, se usaron 1.5 g de agarosa standard-lowm_r (Biorad), 15 ml de TBE 5X y se aforó a 75 ml con agua miliQ.

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

ANEXO 3. Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford

Se diluyeron 10 µl de suero en 100 µl de agua destilada. De esta dilución se tomaron por duplicado alícuotas de 10 µl para la determinación de proteínas. Además se preparó la curva estándar por duplicados con las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 µl (1 µg/µl BSA). Se adicionó a todos los tubos 5 ml del colorante (Bio-Rad), se esperó 5 min. y se leyó en el espectrofotómetro a 595 nm.

ANEXO 4. Ensayo enzimático inmunométrico de leptina (ELISA)

Para la medición de la leptina en suero se utilizó el kit colorimétrico de leptina marca CALBIOCHEM; la sensibilidad del ensayo es de 4.76 pg/ml. Este kit utiliza un anticuerpo policlonal para la leptina, el

cual está inmobilizado en la placa para unir la leptina de las muestras. Después de una incubación de corta duración, se lava el exceso de la muestra y se adiciona un anticuerpo policlonal para la leptina de ratón marcada con peroxisidasa de rábano. Este anticuerpo marcado se une a la leptina capturada en la placa. Después de una incubación, se lava el exceso del anticuerpo y se adiciona el sustrato. El sustrato reacciona con el anticuerpo marcado el cual está unido a la leptina.

Se lavó la placa dos veces con 200 μ l de la solución de lavado (solución detergente salina de fosfatos). Se depositan 100 μ l del buffer de ensayo (solución salina de fosfatos, contiene proteínas y detergentes) en el pozo S0 (0 pg/ml) y 100 μ l de las soluciones estandar del 1 al 7 en los pozos correspondientes, la concentración de la leptina en la curva estándar queda de la siguiente manera: 6,400; 3,200; 1,600; 800; 400; 200 y 100 pg/ml, respectivamente. Posteriormente se depositan las muestras (25 μ l de suero más 75 μ l de buffer de ensayo) en los pozos correspondientes, se agita ligeramente la placa, se tapa y se incuba por una hora a 37 °C. Después de la incubación se lava la placa 10 veces adicionando 200 μ l de la solución de lavado y posteriormente se aspira el contenido de los pozos. Se adicionan 100 μ l del anticuerpo de conejo contra la leptina de ratón en todos los pozos excepto en el blanco y se incuba la placa 30 min. a 37 °C. Se lava la placa 10 veces adicionando 200 μ l de la solución de lavado y después de la última lavada se aspira el contenido de la placa. Posteriormente se adiciona a cada pozo 100 μ l de la solución de sustrato (1 tableta TMB, 2.5 ml del buffer de sustrato [solución de fosfatos], 2.75 ml de una solución de hidróxido de peróxido al 0.01%). Se incuba la placa durante 30 min. en la obscuridad a temperatura ambiente; para detener la reacción se adiciona a cada pozo 100 μ l de la solución de ácido sulfúrico 1 N en agua para detener la reacción. Posteriormente se realiza la lectura, el espectrofotómetro se calibra con el blanco a 450 nm; la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de la leptina en la muestra. Los resultados se expresan en pg/ml y se obtienen por regresión lineal.

ANEXO 5. Radioinmunoensayo de Corticosterona

Muestras de suero: se tomaron 4 μ l de suero y se adicionaron 2 ml de amortiguador diluyente de esteroides (50 mM amortiguador de fosfatos pH 7.5 y 150 mM de NaCl). De esta dilución se tomaron 500 μ l de todas las muestras.

Curva estándar: Se tomaron 500 μ l de las soluciones preparadas (Corticosterona estándar ICN Farmacéutica) que contenían 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, y 5000 pg/500 μ l. Se pusieron los siguientes volúmenes de amortiguador diluyente de esteroides: tubos de B0 (ausencia de la hormona en cuestión), 500 μ l; en los tubos NSB (unión no específica), 500 μ l + 100 μ l amortiguador fosfatos; y en los tubos T (totales), 600 μ l.

Todos los tubos se incubaron a 98 °C durante 10 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

El anticuerpo (Ab) se preparó a partir de alícuotas de 20 μ l a una dilución inicial de 1:12. Cada alícuota se diluyó con 1.98 ml de agua destilada, obteniendo una dilución de trabajo de 1:1200. Se adicionaron a todos los tubos (excepto los T y NSB) 100 μ l de Ab. Posteriormente se adicionaron 100 μ l de la corticosterona tritiada (1 μ l 3 H-Cor + 9 ml buffer diluyente= 10,000 cpm/100 μ l) a todos los tubos. Se mezclaron los tubos con un vórtex y se incubaron durante 24 hrs. a 4 °C. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 200 μ l de una solución de carbón-dextrán a 4 °C (excepto a los T) y se agitaron los tubos. Se incubaron durante 20 min a 4 °C y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 min. El sobrenadante de cada tubo se transfirió a tubos para conteo de radiaciones β y se adicionaron 4 ml de líquido de centelleo (Ecolite, ICN). Cada tubo fue medido en un contador de radiaciones β (Beckman) durante un minuto, empezando por la curva estándar.

Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de corticosterona utilizando el Software "enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en ng de corticosterona por ml de suero.

ANEXO 6. Radioinmunoensayo para TSH

La curva estándar (por triplicado) y los controles (por duplicado) fueron preparados de la siguiente manera: a los tubos NSB se les adicionó 300 μ l de amortiguador RIA (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.25% BSA + 50 mM EDTA), a los tubos Bo se les adicionó 200 μ l del amortiguador RIA y 100 μ l de Ab contra TSH (1 μ l Ab contra TSH/300 μ l amortiguador, dilución 1:375,000). Posteriormente, se preparó la curva estándar de TSH con 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 pg/200 μ l de amortiguador RIA y se les adicionó 100 μ l de Ab contra TSH.

También se preparó una curva con suero de ratas controles (eutiroideas). Se prepararon tubos con 10, 25, 50, 100 y 200 μ l de suero, se completaron a 200 μ l con amortiguador RIA y se adicionó 100 μ l de Ab contra TSH.

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

Posteriormente se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente por 18-24 horas. Terminado el tiempo de incubación, se adicionaron a todos los tubos 100 μ l de 125 I-TSH (10,000 cpm) y se incubaron de nuevo a temperatura ambiente entre 18 y 24 hrs. Después se adicionaron a los tubos (excepto los T) 100 μ l de anticuerpo contra IgG de conejo (dilución de 1:40 en PBS [amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 y 150 mM de NaCl]) y 100 μ l de suero normal de conejo al 2% en PBS. Todos los tubos se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 2 hrs. Terminado el tiempo de incubación, se agregó a todos los tubos (excepto los T) 1 ml de polietilenglicol al 4 % en PBS y se centrifugaron a 5,000 rpm durante 30 min. Se aspiró el sobrenadante y se procedió a la lectura de cada tubo en un contador beta.

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

ANEXO 7. Radioinmunoensayo de las Hormonas Tiroideas

Radioinmunoensayo de T3

Para medir la concentración sérica de T3 se utilizó el kit "Coat-A-Count total T3" de la marca DPC; la sensibilidad del ensayo es de 7 ng/dl y el antisuero de "Coat-A-Count total T3" es altamente específico para la T3, con una reactividad cruzada del 100% para la T3 y extremadamente baja con otros compuestos que se encuentran de manera natural en las muestras. Además, si existieran en las muestras amplias variaciones de concentraciones proteicas no tienen un efecto significativo con el ensayo de "Coat-A-Count total T3".

“Coat-A-Count total T3” es un radioinmunoensayo de fase sólida, donde la T3 total marcada con ^{125}I compete durante un tiempo fijo con la T3 de la muestra del animal por sitios de unión con el anticuerpo. Esta reacción tiene lugar en presencia de agentes bloqueadores que sirven para liberar la T3 unida a las proteínas transportadoras; de ahí que el ensayo mide T3 total, ya que tanto la T3 libre y la T3 unida a proteínas de la muestra pueden competir con la T3 marcada radiactivamente por los sitios de unión del anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado a la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competencia y aislar la fracción de T3 marcada radiactivamente unida al anticuerpo.

Antes de iniciar el procedimiento todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente. Se marcaron cuatro tubos de ensayo: 2 tubos T y 2 tubos NSB. De los tubos recubiertos con “T3 total Ab”, se marcaron por duplicado la curva estándar desde la A (unión máxima) hasta la F; la curva va de 0, 20, 50, 100, 200 y 600 ng/dl de T3, también se marcaron por duplicado los tubos para las muestras.

Posteriormente se colocaron 100 μl del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 100 μl de cada uno de los calibradores restantes y de las muestras sin diluir en cada tubo previamente marcado. Se agregó 1 ml de ^{125}I T3 a todos los tubos y se agitaron en vórtex breve y suavemente. Se incubaron los tubos durante 2 horas a 37 °C en baño maría. Después de la incubación se decantaron por completo los tubos excepto los T. Finalmente se contaron los tubos en el contador gamma durante 1 min. por tubo. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a ng de T3 utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en ng/dl.

Radioinmunoensayo de T4

Para medir la concentración sérica de T4 se utilizó el kit “Coat-A-Count total T4” de la marca DPC; la sensibilidad del ensayo es de 0.25 $\mu\text{g/dl}$ y el antisuero de “Coat-A-Count total T4” es altamente específico para la T4, con una reactividad cruzada del 100% para la T4 y extremadamente baja con otros compuestos que se encuentran de manera natural en las muestras. Además, si existieran en las

muestras amplias variaciones de concentraciones proteicas no tienen un efecto significativo con el ensayo de “Coat-A-Count total T4”.

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

Antes de iniciar el procedimiento todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente. Se marcaron cuatro tubos de ensayo: 2 tubos T y 2 tubos NSB. De los tubos recubiertos con “T4 total Ab”, se marcaron por duplicado la curva estándar desde la A (unión máxima) hasta la F; la curva va de 0, 1, 4, 10, 16 y 24 µg/dl de T4; también se marcaron por duplicado los tubos para las muestras. Posteriormente se colocaron 25 µl del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 25 µl de cada uno de los calibradores restantes y de las muestras sin diluir en cada tubo previamente marcado. Se agregó 1 ml de ¹²⁵I T4 total a todos los tubos y se agitaron en vórtex breve y suavemente. Se incubaron los tubos durante 1 hora a 37°C en baño maría. Después de la incubación se decantaron por completo los tubos excepto los T. Finalmente se contaron las muestras en el contador gamma durante 1 min. por tubo. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a µg de T4 utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en µg/dl.