



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE PRO-TRH
EN EL NPV DEL HIPOTÁLAMO Y DEL EJE TIROIDEO
EN LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN
CONTRA LA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA FORZADA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

ELIZABETH LORRAINE JAIMES HOY

TUTOR: DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO



MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE PRO-TRH EN EL NPV DEL HIPOTÁLAMO Y DEL EJE TIROIDEO EN LA ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN CONTRA LA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA FORZADA

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Doctorado 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 Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Patricia de Gortari Gallardo	Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM"
Dr. Iván Velasco Velázquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Patricia Joseph-Bravo	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce y agradece la colaboración y asesoría 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 y agradece a la Dra. Lucía Martínez Mota su ayuda y asesoría en la prueba de enterramiento defensivo, que se llevó a cabo en su laboratorio de Farmacología Conductual, en el Departamento de Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM".

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

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

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Ma. De Lourdes Massieu Trigo	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Ignacio Camacho Arroyo	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Julio Morán Andrade	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dra. Marta Menjivar Iraheta	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Iván Velasco Velásquez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

INDICE

I.	Introducción	7
	Regulación Hipotalámica de la Homeostasis Energética	8
	Núcleo Arcuato (ARC)	8
	Núcleo Paraventricular del hipotálamo (NPV)	10
	Hipotálamo Lateral/área perifornical (HL)	11
	Regulación hormonal periférica de la Homeostasis Energética	12
	Anorexia	14
	Anorexia Inducida por Deshidratación	14
	El mesencéfalo en la anorexia inducida por deshidratación	15
	El telencéfalo en la anorexia inducida por deshidratación	16
	Aspectos Generales de la Hormona Liberadora de Tirotropina	17
	La Hormona Liberadora de Tirotropina participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo	17
	Estructura del gen de la hormona liberadora de tirotropina y su biosíntesis	18
	Receptores de TRH	20
	Inactivación de TRH	21
	Regulación del metabolismo del TRH en el eje neuroendócrino	22
	Hormonas tiroideas	22
	Glucocorticoides	23
	Leptina y Péptidos Hipotalámicos	23
	Otros estímulos	25
	El TRH como neuromodulador	25
	Regulación de las neuronas TRHérgicas en diferentes modelos de restricción energética	26
II.	Justificación	27
III.	Hipótesis	29
IV.	Objetivos	29
V.	Materiales y Métodos	30
VI.	Resultados	43
	Ingesta de alimento y líquido	43
	Cambios en el peso corporal	45
	Cinética de cambios en el eje-hipotálamo-hipófisis-tiroideo	46
	Cambios del eje-hipotálamo-hipófisis-tiroideo al séptimo día	49

	Respuesta neuroendócrina a la exposición al frío	53
	Prueba de enterramiento defensivo: modelo de ansiedad	57
VII.	Discusión	59
VIII.	Conclusiones y Perspectivas	67
IX.	Referencias	68
X.	Anexo	90
	Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. Horm Behav. 2008 Feb; 53(2):366-77	

RESUMEN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) sintetizada en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HHT). 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 (T_3 , triyodotironina y T_4 , tiroxina); paradójicamente la retroalimentación negativa está bloqueada debido a la disminución de la concentración circulante de leptina. El objetivo del estudio fue definir si existe una regulación diferencial en el funcionamiento del eje tiroideo entre la RA y la AN; y evaluar la respuesta neural en condiciones de un balance energético negativo ante un estímulo agudo como el frío. 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 alimentaria forzada (RA): consumo libre de agua y consumo de alimento isocalórico al grupo AN. Se disecaron el hipotálamo dorsal y mediobasal para la cuantificación de TRH por radioinmunoensayo (RIA), el NPV para semicuantificar el RNAm de pro-TRH, TRH-R1 (receptor tipo 1 para TRH) y pro-CRH (precursor de la Hormona liberadora de corticotropina); y la adenohipófisis para la semicuantificación de TRH-R1 y PPII (enzima degradativa de TRH) por RT-PCR. En suero se midió la concentración de leptina por ELISA; y corticosterona, hormonas tiroideas, estradiol, prolactina y TSH por RIA. El grupo AN y RA disminuyeron su consumo de alimento un 83% y perdieron un 20% de peso vs el control (100%). En ambos grupos disminuyó la concentración sérica de leptina y estradiol, mientras que la concentración de corticosterona aumentó; la concentración sérica de prolactina disminuyó en la RA y no cambió en la AN. En la RA, el eje tiroideo se encontró inhibido: aumentó el contenido de TRH en la eminencia media, la expresión de pro-TRH y de TRH-R1 en el NPV disminuyó sugiriendo una inhibición de la liberación hipotalámica de TRH; TSH, T_3 y T_4 disminuyeron (hipotiroidismo terciario). En la AN el contenido de TRH disminuyó en la eminencia media y la expresión de pro-TRH del NPV aumentó, sugiriendo una liberación hipotalámica del TRH. La concentración sérica de TSH aumentó, y las hormonas tiroideas disminuyeron (hipotiroidismo primario). La expresión de pro-CRH en el NPV en la RA y la AN disminuyó. En la adenohipófisis, la expresión de TRH-R1 en la RA aumentó vs el control y la AN. No se encontraron cambios en la expresión de la PPII. Los animales controles y de RA expuestos al frío presentaron una activación de las neuronas TRHérgicas del NPV, sin embargo en la AN no se observó un estímulo aditivo ante la exposición al frío. La concentración sérica de TSH aumentó solamente en los controles, T_4 aumentó en todos los grupos siendo mayor en la AN, y T_3 aumentó solamente en la RA y la AN. Estos resultados revelan que existe una regulación diferencial del eje HHT entre la RA y la AN, presentándose un hipotiroidismo terciario en la RA, y un hipotiroidismo primario en la AN. En los animales con RA se conservó la respuesta neural TRHérgica a la exposición al frío, pero no en los animales con AN.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	hormona α estimulante del melanocito
Ab	anticuerpo
ACTH	hormona adrenocorticotrópica
AgRP	péptido relacionado al agouti
AN	anorexia inducida por deshidratación
CART	transcrito regulado por cocaína y amfetamina
CRH	hormona liberadora de corticotropina
GC	glucocorticoides
GH	hormona del crecimiento
GR	receptor a glucocorticoides
HD	hipotálamo dorsal
HHA	hipotálamo-hipófisis-adrenal
HHT	hipotálamo-hipófisis-tiroides
HL	hipotálamo lateral
HMB	hipotálamo mediobasal
i.c.v.	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	piroglutamyl peptidasa II
PRL	prolactina
RA	restricción alimentaria forzada
SNC	sistema nervioso central
T ₃	triyodotironina
T ₄	tiroxina
TRH	hormona liberadora de tirotrópina
TRH-R1	receptor tipo 1 de la hormona liberadora de tirotrópina
TRH-R2	receptor tipo 2 de la hormona liberadora de tirotrópina
TSH	tirotrópina

I. INTRODUCCIÓN

El mantenimiento del peso y la composición corporal dependen de una regulación central a través de regiones hipotalámicas y no hipotalámicas, así como de un control periférico a través de órganos del tracto gastrointestinal y del tejido adiposo, entre otros (Horvath et al., 2004; Bray, 2000; Havel, 2001). La interacción entre ambos sistemas está mediada por señales nerviosas, hormonas, neuropéptidos, nutrimentos y metabolitos. En la regulación del apetito y del gasto energético participan regiones hipotalámicas como el núcleo arcuato (ARC), núcleo paraventricular (PVN), el núcleo dorsomedial (DMH), el área hipotalámica ventromedial (VMH) y área hipotalámica lateral (HL), y regiones no hipotalámicas como el núcleo del tracto solitario (NTS) (Horvath et al., 2004). El tracto gastrointestinal (estómago, intestino, páncreas, hígado) informa al sistema nervioso central (SNC) de la ingesta de alimentos y de la homeostasis energética a través de señales metabólicas, mediadas por quimiorreceptores así como por señales neuroendocrinas específicas (Broberger y Hokfelt, 2001; Berthoud, 2002).

Determinados factores orexigénicos y anorexigénicos, como pueden ser la grelina, insulina, leptina, entre otros, se generan moduladamente en el tracto gastrointestinal y el tejido adiposo (en el caso de la leptina) en función al estado nutricional. Dichas señales interactúan con neuropéptidos centrales implicados en la regulación del apetito y gasto energético como el neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada al agouti (AgRP), orexinas, hormona concentradora de melanina (MCH), proopiomelanocortina (POMC), transcripto relacionado a cocaína y anfetaminas (CART), hormona liberadora de corticotropina (CRH), entre otros (Leibowitz y Wortley, 2004; Wynne et al., 2005). En definitiva, el tracto gastrointestinal y el SNC participan conjuntamente tanto en la regulación del apetito, a corto y mediano plazo, así como en el control del gasto energético y, por tanto, en la homeostasis energética y en la estabilidad de peso y composición corporal.

Regulación Hipotalámica de la Homeostasis Energética

El hipotálamo integra información proveniente de señales centrales y periféricas para regular la homeostasis energética (Berthoud, 2002). Los péptidos orexigénicos y anorexigénicos (**Ilustración 1**) que constituyen una gran parte del circuito neuronal que controlan la conducta alimentaria y el peso corporal, son sintetizados por las neuronas localizadas en los diferentes núcleos hipotalámicos (Leibowitz y Wortley, 2004).

Estimulan la ingesta alimentaria	Inhiben la ingesta alimentaria
Neuropéptido Y (NPY)	Hormona liberadora de Tirotropina (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)

Ilustración 1. Péptidos y neurotransmisores hipotalámicos involucrados en el control de la ingesta alimentaria. El lado izquierdo del recuadro señala algunas moléculas orexigénicas, es decir, estimulan la ingesta de alimento y disminuyen el gasto energético. En el lado derecho del recuadro se muestran las moléculas anorexigénicas, es decir, inhiben la ingesta de alimento y aumentan el gasto energético.

Núcleo Arcuato (ARC)

El ARC se localiza en el hipotálamo mediobasal, y ha sido implicado en el control de la conducta alimentaria por varias razones. Primero, estudios realizados tanto en animales (Olney, 1969) como en humanos (Bray y Gallagher, 1975) han demostrado que lesiones en esta estructura hipotalámica provocan hiperfagia y obesidad. Segundo, las neuronas del ARC expresan receptores para diversas hormonas que participan en el control de la conducta alimentaria y de la homeostasis energética, como la leptina, insulina, corticosterona, estrógenos, progesterona y hormona del crecimiento (Elmqvist et al., 1998; Marks et al., 1990; Cintra y Bortolotti, 1992; Jirikowski et al., 1986;

Fox et al., 1990; Kamegai et al., 1996). Tercero, el ARC tiene dos poblaciones diferentes de neuronas (en cuanto a los neuropéptidos que sintetiza). En la parte media del ARC se encuentran neuronas que sintetizan al NPY y al AgRP, los cuáles estimulan la ingesta de alimento y disminuyen el gasto energético; mientras que en la parte lateral del ARC se encuentran neuronas que sintetizan CART y la POMC del cual se deriva otro péptido, la hormona α estimulante del melanocito (α -MSH) los cuáles inhiben la ingesta de alimento y aumentan el gasto energético (Cone et al., 2001).

El NPY es un potente orexigénico, y diferentes estudios han demostrado que la liberación de este neuropéptido al HL y NPV contribuye al aumento en la ingesta de alimento después de un periodo de ayuno (Elmqvist et al., 1999; Kalra et al., 1991). La leptina disminuye el contenido de RNAm de NPY en el ARC, por lo tanto un mecanismo por el cual aumenta el apetito después de un periodo de ayuno es a través del aumento de la síntesis y liberación del NPY en el ARC como consecuencia de la disminución sérica de leptina (Ahima et al., 1999; Woods et al., 1998).

A diferencia de lo que ocurre con el NPY, cuando se inyecta en el hipotálamo α -MSH o agonistas de sus receptores MC3/4, los animales desarrollan anorexia y pierden peso (Giraudou et al., 1998; McMinn et al., 2000). La privación de alimento con la subsecuente pérdida de peso provoca una disminución del RNAm de POMC en el ARC (Schwartz et al., 1997), mientras que la administración de leptina estimula su expresión (Thornton et al., 1997). El α -MSH es un agonista de los receptores MC3/4, los cuáles se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, con una alta expresión en el NPV, en la región perifornical del hipotálamo lateral y en el complejo vago dorsal (Cowley et al., 1999; Kishi et al., 2003; Mountjoy et al., 1994). En cambio, el AgRP es un antagonista endógeno de los receptores MC3/4, el cual estimula el apetito (Kim et al., 2000).

Núcleo Paraventricular del hipotálamo (NPV)

El NPV es una estructura hipotalámica que regula varias funciones motoras asociadas con el balance energético (Berthoud, 2002; 2004). Estas funciones están controladas por dos diferentes grupos de neuronas: células neuroendócrinas que proyectan a la hipófisis y regulan la función endócrina; y neuronas que tienen proyecciones descendentes y que regulan respuestas conductuales y autonómicas (Berthoud, 2002; 2004).

Dentro de las neuronas con funciones neuroendócrinas, el 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 que además de tener funciones endócrinas, dentro del SNC funcionan como neuropéptidos anorexigénicos, estos son la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). Sus axones 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 del NPV también están constituidas por neuronas autonómicas con axones que proyectan a neuronas preganglionares simpáticas en la médula espinal, que pueden influir en procesos asociados con la regulación del metabolismo energético como por ejemplo en la actividad gastrointestinal (Swanson y Sawchenko, 1983).

Además, el NPV integra señales de CRH, NPY, AgRP y del sistema de las melanocortinas provenientes del HL (en el caso de CRH) y ARC (Watts et al., 1999; Sawchenko y Swanson, 1983). El NPV es sensible a la administración de varios péptidos que han sido implicados en la ingesta alimentaria como colecistoquinina (CCK), NPY, grelina, orexinas, leptina y péptido similar al glucagon-1 (GLP-1) (Hamamura et al., 1991; Lambert et al., 1995; Lawrence et al., 2002; Shirasaka et al., 2001; Elmquist et al., 1997; Van Dijk et al., 1996): por ejemplo, la administración de un agonista de las melanocortinas directamente al NPV inhibe el efecto orexigénico que tiene el NPY (Wirth et al., 2001) y la ingesta alimentaria (Giraud et al., 1998); mientras que la administración de un antagonista de las melanocortinas (AgRP) en el NPV tiene el efecto contrario, aumenta la ingesta de alimento (Giraud et al., 1998). También se ha observado que cuando se inyecta en este núcleo hipotalámico el NPY o

noradrenalina, se potencía su efecto sobre la ingesta de alimento (aumentando el consumo) (Leibowitz, 1978; Stanley y Leibowitz, 1985).

La integración de señales que se da en el NPV produce cambios en otros sistemas neuroendócrinos. Proyecciones de NPY/AgRP y del α -MSH del ARC innervan a neuronas TRHérgicas en el NPV (Legradi y Lechan, 1999; Fekete et al., 2000). La liberación de NPY/AgRP en el NPV ejercen un efecto inhibitorio en la expresión de TRH (Fekete et al., 2001; 2002; 2004), como consecuencia disminuye la concentración sérica de las hormonas tiroideas, lo que conlleva a una inhibición del eje tiroideo; mientras que las proyecciones del α -MSH tienen un efecto estimulador y previenen la inhibición de la expresión de TRH en el NPV inducido por el ayuno (Fekete et al., 2000). Las proyecciones de NPY al NPV también actúan sobre las neuronas CRHérgicas influyendo así sobre la homeostasis energética (Sarkar y Lechan, 2003).

Hipotálamo Lateral/área perifornical (HL)

El hipotálamo lateral, conocido como el centro del hambre, está formado por neuronas que sintetizan neuropéptidos que estimulan la ingesta de alimento: las orexinas/hipocretinas (Sakurai et al., 1998) y el MCH (Bittencourt et al., 1992). Adicionalmente, el HL recibe proyecciones de NPY/AgRP del ARC (Elmqvist et al., 1999), y éste núcleo es mucho más sensible que el NPV a los efectos que ejerce el NPY sobre la ingesta de alimento (Stanley et al., 1993).

El ayuno aumenta los niveles del RNAm de MCH, su administración i.c.v. aumenta la ingesta de alimento (Qu et al., 1996) y provoca obesidad en las ratas (Marsh et al., 2002). Mientras que los ratones con alteraciones genéticas del MCH son hipofágicos, presentan un bajo peso y un gasto energético aumentado, a pesar de la disminución en la expresión de POMC en el ARC, y de la baja concentración sérica de leptina (Shimada et al., 1998; Marsh et al., 2002). Estos sistemas orexigénicos ejercen sus efectos a través de proyecciones que tienen en distintas estructuras como el NPV, el ARC, el NTS y el núcleo dorsal del nervio vago (De Lecea et al., 1998; Peyron et al., 1998).

Los niveles del RNAm de la prepro-orexina aumentan durante el ayuno, y su administración central genera una conducta orexigénica (Sakurai et al., 1998; Hagan et al., 1999). Estas neuronas

también expresan receptores para NPY y leptina, lo que permite que puedan integrar señales adipostáticas (Campbell et al., 2003; Horvath et al., 1999).

Dentro de esta integración hipotalámica de las señales periféricas, también están involucradas las neuronas sensibles a la glucosa presentes en el HL (Bernardis y Bellinger, 1996). Algunos estudios han sugerido que las neuronas que expresan orexinas pueden censar la concentración de glucosa dentro de esta región. La hipoglucemia aumenta la expresión de c-Fos en estas neuronas y aumenta los niveles del RNAm de orexinas (Moriguchi et al., 1999; Cai et al., 1999).

Regulación hormonal periférica de la homeostasis energética

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

- 1) Las señales gastrointestinales como la grelina o la colecistoquinina (CCK), ejercen un efecto a corto plazo. Estas señales gastrointestinales llegan al cerebro a través del nervio vago, el cual tiene proyecciones al NTS, ésta región a su vez tiene proyecciones hacia el hipotálamo (Berthoud, 2002). La función de estas señales del tracto gastrointestinal es la de regular la ingesta de alimentos en relación a eventos de tipo sensorial, como por ejemplo proveer información sobre la distensión gástrica, o la presencia de ciertos nutrimentos como por ejemplo de grasas (Broberger y Hokfelt, 2001).

La grelina es un factor orexigénico sintetizado principalmente en el estómago. En humanos, este péptido es regulado por el volumen de alimento ingerido, su concentración sérica baja después de una comida y aumenta en periodos de ayuno (Tschop et al., 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 et al., 2000). La grelina ejerce sus efectos orexigénicos a través de la regulación positiva de la expresión de NPY y AgRP en el ARC (Wang et al., 2002).

La CCK se sintetiza principalmente en el duodeno y yeyuno. Esta hormona es liberada en el intestino y a la circulación en respuesta a la presencia de nutrimentos en el tracto gastrointestinal, y permanece elevada hasta 5 horas después de su liberación (Liddle et al., 1985). La CCK regula la digestión estimulando la liberación de enzimas pancreáticas y vesiculares, aumentando así la motilidad gástrica y disminuyendo el vaciamiento gástrico (Liddle et al., 1985; Moran y Schwartz, 1994). La administración periférica de CCK a humanos y animales, disminuye la duración y consumo de alimento (Gibbs et al., 1973; Kissileff et al., 1981). Estudios hechos con ratones knockout del receptor tipo A para la CCK han sugerido que ésta hormona actúa en el hipotálamo dorsomedial para inhibir la expresión de NPY (Bi et al., 2001).

- 2) Las señales adipostáticas como la leptina y la insulina, 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 el control de la homeostasis energética. La restricción calórica induce una disminución en la concentración sérica de leptina; este efecto puede revertirse con el consumo de alimento o con la inyección de insulina (Saladin et al., 1995). La circulación de la leptina refleja los depósitos de energía (grasa) y la disponibilidad de nutrimentos.

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 (Schwartz et al., 2000). 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 (Leibowitz et al., 2004; Wynne, 2005).

La concentración sérica de insulina también está positivamente correlacionada con los depósitos de grasa, y después de la ingesta de alimento ésta aumenta rápidamente. En el cerebro, la insulina actúa como una señal anorexigénica, disminuyendo la ingesta de alimento y el peso corporal, a través de la regulación de la expresión del NPY y de POMC en el ARC (Schwartz et al., 2000; Wynne, 2005).

ANOREXIA

En términos generales la anorexia describe simplemente una condición de pérdida del apetito o del hambre con una consecuente pérdida de peso. La anorexia puede clasificarse en dos grandes grupos dependiendo de la etiología de esta condición: la anorexia de origen patológico y la anorexia de origen adaptativo (Watts et al., 2007).

La anorexia de tipo patológico puede subdividirse a su vez en dos, la Anorexia Nervosa, que se ha propuesto ser de origen psicológico, y la anorexia asociada a enfermedades degenerativas como el SIDA y el cáncer. En cambio, el segundo tipo de anorexia aparece como una respuesta adaptativa ante cambios homeostáticos, los cuáles pueden ser de origen externo que acompañan a algún tipo de estrés como la administración de lipopolisacáridos (Valles et al., 2000); o pueden ser de origen fisiológico como la deshidratación (Watts et al., 1999).

ANOREXIA INDUCIDA POR DESHIDRATACIÓN

La deshidratación ocasiona progresivamente en las ratas la reducción de la ingesta de alimento, generando una anorexia. Esta anorexia inducida por deshidratación se origina como una respuesta adaptativa que mantiene la homeostasis de los fluidos corporales, ya que en el proceso de la digestión se utiliza cierta cantidad de agua, y la respuesta del organismo bajo éstas condiciones es ahorrar la mayor cantidad posible de éste líquido. Se ha propuesto que los estímulos iniciales responsables de generar esta anorexia durante la deshidratación son: el aumento de la osmolalidad (deshidratación celular) y posiblemente el sabor de la sal (Watts et al., 2007).

Se han estudiado algunas vías neuronales hipotalámicas en este modelo. Watts y cols. encuentran que las ratas con anorexia inducida por deshidratación y las ratas con restricción alimentaria forzada (pareadas a las ratas con anorexia) presenta las mismas características endócrinas y neuropeptidérgicas que normalmente se observan en la restricción calórica: aumento de la concentración sérica de corticosterona y disminución de la concentración de leptina e insulina; en el ARC encuentran un aumento en la expresión de NPY, y disminución de la expresión de POMC y de neurotensina (Watts et al., 1999). La inyección de una dosis alta de NPY (1 µg) revierte la anorexia cuando se inyecta en el HL, sin tener ningún efecto cuando es inyectado en el NPV; mientras que

dosis más bajas de la inyección de NPY (0.5 µg) no tienen efecto sobre la anorexia en ninguno de estos dos núcleos hipotalámicos (Salter y Watts, 2003).

A pesar de estos cambios neuroendócrinos, las ratas con anorexia continúan disminuyendo su ingesta de alimento; esto sugiere la existencia de otros mecanismos neuronales que se activan durante la anorexia para inhibir el consumo de alimento.

El HL podría ser una estructura que participa en este tipo de anorexia, ya que la expresión de CRH (péptido anorexigénico) aumenta exclusivamente en las ratas deshidratadas antes de que desarrollen la anorexia, además hay una correlación positiva entre el aumento de la expresión de CRH en el HL con el grado de anorexia que presentan los animales (Watts et al., 1999). Adicionalmente, estas neuronas que expresan CRH en el HL tienen proyecciones al NPV (Watts et al., 1999), estructura donde se sintetiza el TRH, otro péptido con efectos anorexigénicos.

El Mesencéfalo en la Anorexia inducida por deshidratación

Además de estudiar los cambios neuroendócrinos en las ratas con deshidratación, Sanders y Ritter (2000; 2001) estudiaron en estos animales, los cambios conductuales y endócrinos ante un estímulo metabólico: la administración de 2-deoxiglucosa. Los animales inyectados con 2-deoxiglucosa ya sea por vía i.v. o i.c.v. presentan algunas respuestas compensatorias como son: aumento de la concentración sérica de corticosterona y de glucosa, y aumento de la ingesta de alimento (Sanders y Ritter, 2000; 2001). Las células glucoreceptoras localizadas en el mesencéfalo son los responsables de mediar estas respuestas ante la inhibición celular de la oxidación de glucosa por la inyección de 2-deoxiglucosa (Sanderes y Ritter, 2000). Los animales con anorexia inducida por deshidratación (ingieren una solución salina al 2.5%) inyectados con 2-deoxiglucosa, presentan el mismo aumento de corticosterona y glucosa en sangre observado en los animales controles (ingieren agua natural), sin embargo la respuesta de incrementar su ingesta de alimento se encuentra inhibida (Salter y Watts, 2003). Estos resultados sugieren que las proyecciones ascendentes del mesencéfalo que proveen de información sobre el estado metabólico del animal no están afectadas en la deshidratación. En su lugar, pareciera ser que la deshidratación actúa específicamente sobre

neuronas en el NPV y el HL para inhibir la ingesta de alimento cuando se inyecta 2-deoxiglucosa (Watts et al., 2007).

Se han reportado cambios similares en pacientes con anorexia nervosa. La administración intravenosa de 2-deoxiglucosa o insulina a sujetos controles genera un aumento del apetito, pero en pacientes con anorexia nervosa no se reporta este aumento del apetito, a pesar de que su concentración sérica de glucosa y corticosterona está aumentada al igual que en los sujetos controles (Nakai y Koh, 2001).

El Telencéfalo en la Anorexia inducida por deshidratación

Neuner y cols. (2006) estudiaron si la manipulación del núcleo accumbens (n. accumbens) podía atenuar la anorexia inducida por deshidratación en las ratas, compararon los efectos de la inyección de muscimol (estimula la ingesta de alimento) en el n. accumbens entre ratas controles y deshidratadas. Encontraron que después de la inyección de muscimol en el n. accumbens, los animales deshidratados disminuyen la cantidad de alimento consumido y el tiempo que pasan alimentándose, comparado con los animales controles. Los autores sugieren que la deshidratación actúa sobre elementos neuronales provenientes del n. accumbens que van hacia el hipotálamo, para así inhibir la ingesta de alimento.

ASPECTOS GENERALES DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)

La hormona liberadora de Tirotropina participa en la regulación del 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. (Boler et al., 1969) y Burgus y cols. (Burgus et al., 1969). Esta neurohormona peptídica es un factor hipotalámico que participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HHT) (Bowers et al., 1971) (**Ilustración 2**). Se sintetiza en el NPV del hipotálamo y es transportado a través de los axones acumulándose en la porción terminal de los nervios en la eminencia media, de donde es liberado. 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). El TSH a su vez, estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T₃ y T₄), las cuáles, por retroalimentación negativa regulan la síntesis del TRH y de 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), a través de la disminución de la concentración del RNAm de TRH en el NPV (Blake et al., 1991; van Haasteren et al., 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 et al., 1996). La exposición al frío induce un aumento en los niveles del RNAm de pro-TRH y su liberación en el NPV (Uribe et al., 1993). Estos cambios llevan a un aumento en la circulación de las hormonas tiroideas, las cuales interactúan con las proteínas desacopladoras en el tejido adiposo pardo aumentando así la producción de calor (Carvalho et al., 1991; Bianco 2005). 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).

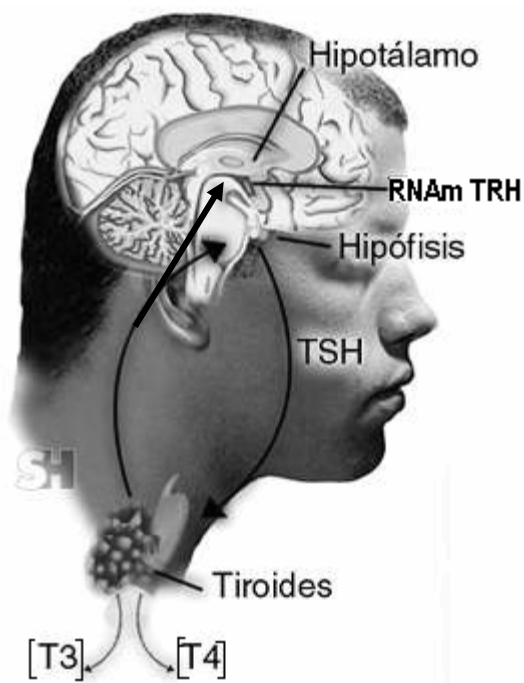


Ilustración 2 El TRH del NPV participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El TRH estimula la síntesis y liberación de TSH en la adenohipófisis, ésta a su vez estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4). Las hormonas tiroideas por retroalimentación negativa inhiben la síntesis de TSH en la adenohipófisis y la síntesis de TRH en el NPV.

Estructura del gen de la hormona liberadora de tirotrópina 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 (pro-TRH) 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 postraduccional de un precursor peptídico de mayor tamaño llamado prepro-TRH. El aislamiento del DNA complementario (cDNA) que codifica para la secuencia de prepro-TRH en *Xenopus laevis* (Richter et al., 1984), en rata (Lechan et al., 1986) 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., 1986) 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 aminoácidos (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-TRH_{154 o 160-255}) (Lechan et al., 1986a; 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 postraduccional de un precursor de mayor tamaño, pro-TRH. 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 como el donador de la amida, mientras que el residuo Gln es ciclizado a pGlu para formar TRH por la glutamil ciclasa (Fischer y Spiess, 1987; Nillni, 1999).

Receptores de TRH

La acción de TRH es mediada vía sus receptores (Gershengorn y Osman, 1996; Sun y Gershengorn, 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 distribución anatómica diferente (Sun y Gershengorn, 2002; Sun y Gershengorn, 2003).

El TRH-R1, se encuentra en la adenohipófisis y es el responsable de la función neuroendócrina del péptido (Nillni, 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); también se encuentra ampliamente distribuido en varias estructuras hipotalámicas como el área anterior y posterior del hipotálamo, el hipotálamo lateral, el NPV y el núcleo dorsomedial (O'Dowd et al., 2000).

Por otro lado, el RNAm del TRH-R2 está localizado en regiones del cerebro como en el área anterior del hipotálamo, áreas del hipotálamo lateral, el NPV, el hipocampo, la corteza frontoparietal (particularmente en áreas somatosensoriales, motoras y olfatorias), la amígdala y el tálamo (Mitsuma et al., 1999; O'Dowd et al., 2000), 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 metaloenzima 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 et al., 1994). Esta enzima hidroliza el enlace de la pyroGlu-his del TRH. Es una metaloenzima de 260 kDa 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 neuronas 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).

La actividad de la PPII en la adenohipófisis de ratas está regulada por el TRH, por las hormonas tiroideas y los estrógenos. Vargas y cols. (1994), reportaron que en un cultivo de células adenohipofisiarias, 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 su administración. Y Schomburg y Bauer (1995), reportaron que la inyección i.p. de T_3 (30 μ g/100 g peso corporal) aumenta la concentración del RNAm de la PPII en la adenohipófisis (10 veces por arriba del valor control). En ratas hipotiroideas (tratadas con *n*-propiltiouracilo, 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 actividad de la PPII en la adenohipófisis también es regulada dependiendo de las condiciones energéticas del animal, por ejemplo en ratas jóvenes (28 días de edad) que han estado en condiciones de ayuno durante 48 hrs, disminuye significativamente la actividad de la PPII en la adenohipófisis (de Gortari et al., 2000).

Adicionalmente, el TRH es degradado en suero por la acción de la tiro liberinasa. Como la PPII, la tiro liberinasa tiene un alto grado de especificidad por el TRH (Schomburg y Bauer, 1995; Friedman et al., 1995; Nillni y Sevarino, 1999), y se ha sugerido que es sintetizada en el hígado (Schmitmeier y Bauer, 2002). La tiro liberinasa también es regulada por la concentración de las hormonas tiroideas en ratas (Ponce et al., 1988), en el hipotiroidismo disminuye la concentración sérica de esta enzima, mientras que en el hipertiroidismo aumenta (White et al., 1976). Además, se ha reportado que en humanos la tiro liberinasa está asociada positivamente al índice de masa corporal, por ejemplo en sujetos obesos (Friedman et al., 1995).

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 (T_4 está baja mientras que TSH está elevada) (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 eutiroides; y la administración de T_4 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 hipofisiarias (De Lean et al., 1977; Gershengorn, 1978; Schomburg y Bauer, 1995) y paralelamente disminuye la respuesta del receptor a TRH.

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 las hormonas tiroideas y paradójicamente también se encuentra disminuido el contenido del RNAm de TRH en el hipotálamo (Blake et al., 1991).

Leptina y Péptidos Hipotalámicos

La leptina juega un papel importante en la regulación neuroendócrina del eje HHT. En el ayuno disminuye la concentración sérica de leptina, inhibiéndose el eje tiroideo y activándose el eje adrenal (van Haasteren et al., 1995). En condiciones de ayuno o restricción alimentaria cuando la concentración sérica de leptina es baja, disminuye el RNAm de pro-TRH en el NPV y la concentración sérica de las hormonas tiroideas, mientras que la concentración de corticosterona aumenta (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 que han estado en ayuno por 48 hrs (Kim et al., 2000).

La leptina regula la biosíntesis de pro-TRH del NPV y su liberación hipotalámica (**Ilustración 3**): 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 (péptido anorexigénico), 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).

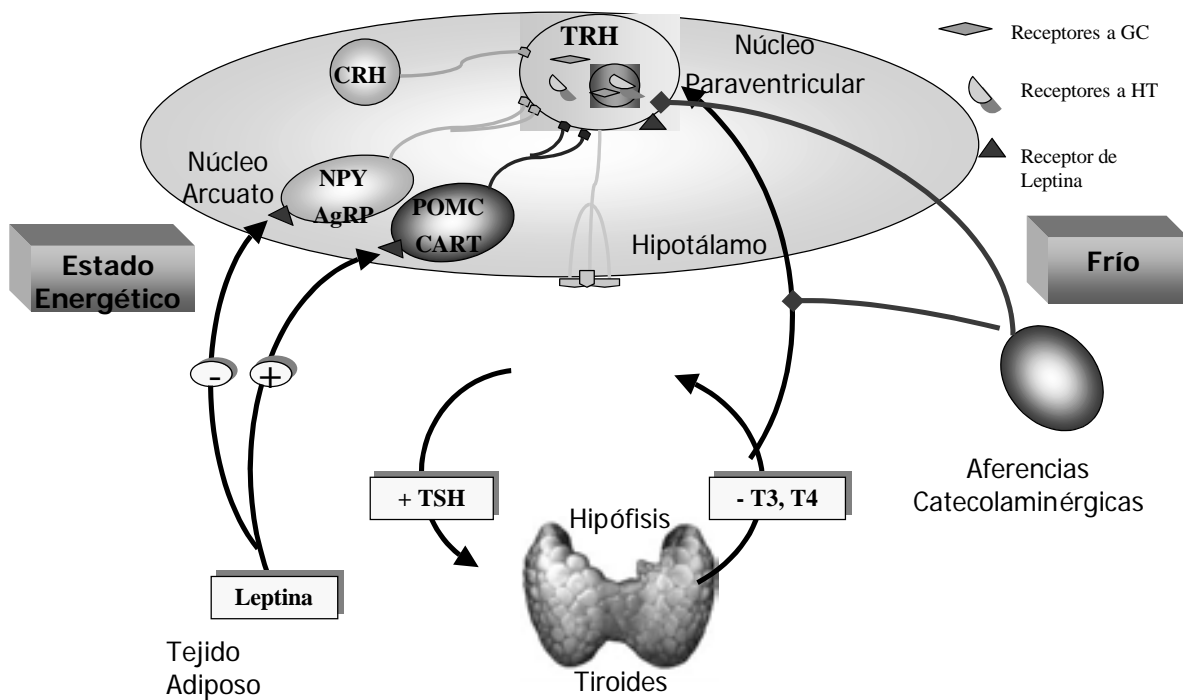


Ilustración 3. Regulación del eje tiroideo por la leptina a través de su acción directa o indirecta sobre las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo. La secreción de leptina del tejido adiposo estimula la expresión hipotalámica de TRH, el cual es necesario para la producción normal de TSH y de hormonas tiroideas en la adenohipófisis y glándula tiroides, respectivamente.

Otros Estímulos

El frío y la succión (ej. durante el amamantamiento) 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, está mediada por mecanismos adrenérgicos (Arancibia et al., 1989) y trae como consecuencia una elevación rápida de la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas.

El estímulo de la succión en ratas, provoca la liberación hipotalámica de TRH, lo que induce la síntesis y liberación de prolactina de la hipófisis, e involucra la activación de neuronas serotoninérgicas que proyectan del núcleo de rafé 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 comúnmente conocida como hormona hipofisiotrópica, este péptido, también puede funcionar como neuromodulador en el SNC debido a que presenta las siguientes características: más del 50% de TRH se localiza en terminales 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 (Bauer et al., 1999).

El TRH induce varias funciones. La inyección i.c.v. de TRH en ratas provoca distintos efectos como la inducción del despertar, 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 DE RESTRICCIÓN ENERGÉTICA

La restricción calórica ejerce efectos sobre el eje HHT: La expresión de TRH en el NPV disminuye, mientras que el contenido del péptido aumenta en la eminencia media, sugiriendo una inhibición de su liberación, lo cual se puede corroborar por la disminución en la concentración sérica de TSH y de las hormonas tiroideas, que se observa tanto en ratas machos como hembras (Blake et al., 1991; van Haasteren et al., 1995; 1996) y la realimentación (van Haasteren et al., 1995) o la inyección de leptina restablecen la actividad del eje tiroideo (Legradi et al., 1997). Estos cambios del eje tiroideo surgen como una respuesta adaptativa inducida por la restricción calórica, que conduce a la preservación de energía en situaciones de un balance energético negativo.

En nuestro laboratorio también se ha estudiado los cambios en el metabolismo de TRH en el SNC en condiciones de ayuno: en las ratas adultas con un periodo de ayuno de 48 h, aumenta el contenido 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 del TRH en la conducta alimentaria es independiente, al de su papel como hormona.

II. JUSTIFICACIÓN

Hasta este momento todavía no han sido dilucidados por completo los mecanismos neuronales responsables de desarrollar los distintos tipos de anorexia, sin embargo se sugiere que por lo menos deben de compartir un mecanismo o una vía neuronal en común que sería responsable de regular la conducta alimentaria y el peso corporal.

En algunos modelos conductuales, 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-Mariscal et al., 2008); en modelos genéticos de ansiedad está aumentado el prepro-TRH 178-199 (Suzuki et al., 2001) en el NPV del hipotálamo.

También el metabolismo del TRH es regulado por el estado energético en el que se encuentra el animal, por ejemplo, en la restricción calórica (ayuno forzado durante 24 h, y restricción forzada por 48 h) se observa una disminución de la actividad del eje tiroideo: disminuye la expresión de pro-TRH en el NPV, mientras que en la eminencia media (de donde es liberado el péptido) aumenta el contenido de TRH, como consecuencia disminuye en suero la concentración de TSH y de las hormonas tiroideas, generándose un hipotiroidismo terciario (Blake et al., 1991; Rondeel et al., 1995; Van Haasteren et al., 1995, 1996; de Gortari et al., 2000). Por lo tanto, uno de los propósitos de este trabajo es estudiar cómo se regula el eje tiroideo en un diferente modelo de restricción calórica, donde el animal voluntariamente reduce su ingesta de alimento, pero que también se encuentra en un estado de balance energético negativo.

Para esta finalidad, se propone utilizar el modelo de anorexia inducida por deshidratación, el cual resulta ser un paradigma útil para estudiar los cambios neuroendócrinos durante la anorexia en las ratas, ya que la anorexia se genera a partir del segundo día de que los animales ingieren una

solución salina al 2.5% reduciendo su ingesta de alimento en un 75% al quinto día; y cuando se les restituye la solución salina por agua, en minutos los animales restablecen su ingesta de alimento (Watts et al., 1999). Por lo tanto, este modelo puede ayudar a estudiar cuáles son las vías neuronales que regulan la ingesta de alimento (específicamente las que la inhiben), en dónde se localizan y cómo están organizadas. Adicionalmente, se ha reportado que en las ratas con anorexia inducida por deshidratación aumenta la concentración del RNAm de CRH en el hipotálamo lateral; estos cambios no se observan en las ratas con una restricción alimentaria forzada. El aumento en la concentración del RNAm de CRH en el hipotálamo lateral está correlacionado positivamente con la intensidad de la anorexia que desarrollan los animales (Watts et al., 1999), por lo que se ha implicado al CRH de esta región en la anorexia inducida por deshidratación. Además, las neuronas CRHérgicas del hipotálamo lateral tienen innervaciones hacia el NPV (Watts et al., 1999), por lo que sugerimos que es posible que las neuronas TRHérgicas del NPV pudieran ser un blanco de acción del CRH en la anorexia inducida por deshidratación.

También proponemos estudiar la respuesta neuronal hipotalámica de TRH en los animales con una restricción calórica (forzada y voluntaria) ante un estímulo adicional como es el frío. El ayuno es un estrés de tipo fisiológico, que como ya se mencionó inhibe el eje tiroideo, sin embargo existen otros tipos de estrés que también regulan el metabolismo del TRH, como por ejemplo, el frío que es un estrés físico de origen externo. En este caso, se observa en los animales una activación del eje tiroideo: aumenta la expresión de TRH en el NPV, y la liberación de TSH y de las hormonas tiroideas (Arancibia et al., 1996; Pacak y Palkovits, 2001; Sánchez et al., 2001, 2007).

III. HIPÓTESIS

La regulación diferencial en la actividad de las neuronas TRHérgicas del NPV y del funcionamiento del eje tiroideo en las ratas con anorexia inducida por deshidratación comparadas con las de restricción alimentaria forzada, sugerirán la participación de este neuropéptido en la regulación central de la conducta alimentaria.

IV. OBJETIVOS

General:

Definir cómo se regula el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo en la restricción alimentaria forzada (RA) y en la anorexia inducida por deshidratación (AN, restricción alimentaria voluntaria) en ratas hembras.

Específicos:

1. Comparar los cambios en el metabolismo de TRH del NPV y el funcionamiento del eje tiroideo en un modelo animal de anorexia (restricción voluntaria del consumo de alimento) contra un modelo animal de consumo restringido de alimento (restricción forzada).
2. Estudiar si la restricción energética crónica, afecta la respuesta neuronal TRHérgica del NPV ante un estímulo agudo como la exposición al frío.
3. Evaluar si la restricción calórica induce conductas de ansiedad de manera diferencial entre la restricción alimentaria forzada y la anorexia inducida por deshidratación, utilizando la prueba de enterramiento defensivo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Animales

En todos los experimentos se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar en edad adulta (250 g de peso), las cuales se mantuvieron en cajas individuales para registrar su consumo de alimento y agua, estuvieron en condiciones controladas de 12 h de luz-oscuridad (luz de las 7 a las 19 hrs) y a una temperatura controlada de 23°C. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM", excepto los experimentos de exposición al frío los cuales se llevaron a cabo en el bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM. Antes de iniciar el experimento, hubo una semana de adaptación en 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 tuvieran un peso homogéneo al iniciar el experimento.

Experimentos

En todos los experimentos realizados, se ofrecieron a las ratas 50 g de alimento diariamente (excepto al grupo de restricción alimentaria forzada) y 150 ml de líquido. Los experimentos tuvieron una duración de 7 días. Los grupos que se formaron fueron los siguientes:

1. Grupo Control (C): con consumo de alimento y agua *ad libitum*.
2. Grupo de Anorexia por deshidratación (AN): con consumo de alimento *ad libitum* y una solución salina al 2.5% (NaCl de SIGMA) como medio de bebida (Watts et al., 1999).
3. Grupo de Restricción Alimentaria Forzada (RA): con consumo de agua *ad libitum* y la misma cantidad de alimento que consumía en promedio el grupo de la anorexia.

Experimento de Cinética.

Con la finalidad de conocer en qué momento del experimento se presentan cambios significativos en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo en las ratas con anorexia y en la restricción alimentaria forzada, se sacrificaron los animales en diferentes tiempos: día 1, 3, 5 y 7 de iniciado el experimento.

Experimento de Exposición al Frío.

Se realizó un experimento independiente, donde los tres grupos de animales mencionados anteriormente fueron sometidos a un estímulo agudo el séptimo día de iniciado el experimento. De cada grupo se seleccionaron aleatoriamente 5 ratas, las cuales fueron introducidas a un cuarto frío a 4°C durante una hora. Transcurrida la hora, todos los animales fueron sacrificados inmediatamente.

Los animales se pesaron diariamente de 9-10:00 h y se alimentaron hasta el día del sacrificio. Se registró también el consumo de alimento e ingesta de líquido diariamente.

Para el experimento de cinética se sacrificó a los animales en el día 1, 3, 5 y 7; para los experimentos sucesivos los animales fueron sacrificados al séptimo día 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 semi-cuantificar la expresión de los RNAm's de TRH-R1 y de la PPII, por RT-PCR.

De los cerebros congelados, se hicieron manualmente cortes coronales (aprox. -0.6 a -3.6 mm de bregma [Paxinos, 2005]) para disectar el hipotálamo dorsal (HD: H 7.2 a 8.2 mm; L -1.0 a 1.0 mm) y el hipotálamo mediobasal (HMB: H 8.2 a 9.8 mm; L -1.0 a 1.0 mm) para cuantificar el contenido de TRH por radioinmunoensayo (RIA). Para otra serie de experimentos se disectó manualmente el NPV del hipotálamo utilizando un ponche de 1 mm de diámetro, el cual se obtuvo de un corte coronal (H 7.2 a 8.2 mm; L -0.5 a 0.5 mm [Paxinos, 2005]), para semi-cuantificar los RNAm's de pro-TRH, TRH-R1 y pro-CRH, por RT-PCR.

El suero se usó para cuantificar la concentración de proteínas por el método de Bradford (Bradford et al., 1976), de leptina por el método de ELISA (para evaluar cambios metabólicos que pudieran estar relacionados con la pérdida de peso) y la concentración de corticosterona (como medida del estrés), TSH, y hormonas tiroideas (T_3 y T_4) (como medida de la adaptación del eje tiroideo), estrógenos y prolactina, por RIA.

Adicionalmente se disectó la grasa blanca (ovárica) y la grasa parda (subescapular), y se pesaron inmediatamente después de la disección.

Extracción de TRH.

Los hipotálamos disectados (HD e HMB) fueron homogenizados en 500 μ l de ácido acético al 20% con un sonicador (vibra cell VC 130). Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C (Eppendorf Centrifuge 5810 R). Se extrajeron 420 μ l del sobrenadante y se colocaron en tubos de microcentrífuga. Se agregaron 800 μ l de metanol al 100%, se agitaron las muestras en un vórtex (Daigger Vortex Genie 2) y se guardaron a -20°C durante 12 h. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se extrajo todo el sobrenadante y se colocó en otros tubos de microcentrífuga para la evaporación del líquido (Vacufuge concentrator 5301) por un periodo de 3 h para después obtener el pellet para la cuantificación de TRH por RIA.

Radioinmunoensayo de TRH.

Se preparó por triplicado una curva estándar conteniendo concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg de TRH en 100 μ l de amortiguador RIA (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 + BSA al 0.25% + 150 mM NaCl + azida de sodio al 0.02% en agua desionizada). También se preparó por triplicado un estándar interno hipotalámico con 20, 40, 80 y 160 μ l de un extracto de tejido evaporado a sequedad y resuspendidos en 100 μ l de amortiguador RIA. Las muestras de TRH fueron evaporadas y resuspendidas en el amortiguador RIA de acuerdo al contenido esperado de TRH. Para el hipotálamo dorsal se adicionaron 500 μ l, y para el hipotálamo medio basal se agregaron 250 μ l. Se agitaron las muestras en el vórtex y se centrifugaron durante 5 min a 12,000 rpm a 4°C. Se tomaron por duplicado 100 μ l de cada muestra y se colocaron en tubos de vidrio de 12 x 75 mm. Posteriormente se prepararon los tubos controles: los totales (T) (cuentas por minuto (cpm) totales), los NSB (unión no específica) y se adicionaron 200 μ l de amortiguador RIA y por último se prepararon los tubos Bo (ausencia de TRH) y se adicionaron 100 μ l de amortiguador RIA. A todos los tubos, excepto los T y NSB, se agregaron 100 μ l de anticuerpo contra TRH (R_2 dilución de trabajo, 1:10,000) (Joseph-Bravo et al., 1979) y después se adicionó a todos los tubos 100 μ l (5,000 cpm) de I^{125} TRH. Se incubaron los tubos entre 36 y 48 h a 4°C.

Terminado el tiempo de incubación, se precipitaron todas las muestras, excepto los T, con 1 ml de etanol absoluto frío, se centrifugaron (Beckman J-6B) a 3,000 rpm durante 30 min a 4°C. Se aspiró el sobrenadante con un extractor de vacío y se realizó la lectura de las cpm en un aparato de conteo de radiaciones gamma (LKB Wallace Miligamma Counter). Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de TRH, utilizando el Software "enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log.

Extracción del RNA total por el método de tiocinato de guanidina.

Se extrajo el RNA total del NPV y de la adenohipófisis por el método de tiocinato de guanidina (Chomczynski et al., 1987). Para la purificación del RNA, se agregó a los tejidos congelados 150 µl de solución D (4 M de tiocinato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio, 0.5% de sarcosil pH 7.0, y 0.1 M de β-mercaptoetanol), posteriormente los tejidos fueron homogenizados con un sonicador (Sonic Vibra Cell Ultrasonic Processor). Y se adicionaron las siguientes soluciones agitando en el 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 reposando las muestras en hielo durante 15 min. y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó un volumen de isopropanol. Se guardaron las muestras a -20°C durante toda la noche.

El segundo día se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 30 min 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 14,000 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 durante 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 14,000 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

14,000 rpm durante 12 min a 4°C (este paso se realizó 2 veces), se obtuvo el sobrenadante y el precipitado se secó en el savant durante 5 min. Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 30 µl de agua y se realizó la lectura de las muestras en un espectrofotómetro (Eppendorf) a 260, 230 y 280 nm. Si la relación 260/230 de las muestras fuera menor a 1.5 se adicionaría 1/25 de acetato de sodio más 3 volúmenes de etanol, y se almacenaban las muestras a -20°C, repitiéndose los pasos del tercer día. Por último se prepararon alícuotas de 1.5 µg de RNA en 12 µl de agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) para realizar más tarde la transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), también se prepararon otras alícuotas de 0.5 µg de RNA en 4 µl de agua tratada con DEPC para verificar más tarde por electroforesis que el RNA no estuviera degradado.

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

Las alícuotas preparadas con una concentración de 1.5 µg de RNA se calentaron en baño maría a 65°C durante 5 min y posteriormente se colocaron las muestras directamente en hielo. Se adicionó a cada tubo la mezcla de RT: 8.9 µl de agua bidestilada tratada con DEPC, 6.0 µl de buffer RT 5 X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 3.0 µl de ditiotreitól (DTT, 0.1M 10 X), 0.6 µl de dNTPs 10 mM, 1.0 µl de oligo dT (0.5 µg/µl) y 0.5 µl de transcriptasa reversa (M-MLV RT, 200 u/µl). Se incubaron las muestras a 37°C durante 2 h. Al término de la incubación se tomaron 4 µl de la mezcla de reacción de cDNA y se adicionó la mezcla de PCR a cada tubo: 35 µl de agua bidestilada estéril, 5 µl de buffer Taq DNA polimerasa (5 u/µl) 10 x, 1.0 µl de dNTPs 10 mM, 1.0 µl del correspondiente oligonucleótido sentido y antisentido, 2.5 µl de MgCl (1.5 mM) y 0.5 µl de Amplificasa 5 u/µl (Biogénica).

Posteriormente se colocaron los tubos en el termociclador Eppendorf (Mastercycler Gradient). En la **tabla 1** se muestran las secuencias de los oligonucleótidos analizados, así como de los genes controles, y en la **tabla 2** los ciclos y condiciones de amplificación para cada gen:

GEN	SECUENCIA SENTIDO	SECUENCIA ANTISENTIDO
TRH Lechan et al., 1986	(5'-3'): GGACCTTGGTTGCTGTGCGACTCTGGCTTTG	(5'-3'): ATGACTCCTGCTCAGGTCATCTAGAAGCT
TRH-R1 De la Peña et al., 1992	(5'-3'): ACCCAGAGAAGCAGGCAGCGTGACA	(5'-3'): GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG
CRH Jingami et al., 1985	(5'-3'): AGAAGAGAGCGCCCCTAAAC	(5'-3'): ATCAGAATCGGCTGAGGTTG
PPII Schauder et al., 1994	(5'-3'): GGACACCCAAATAATTGCT	(5'-3'): CTGGATCGCATACAAAAG
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 oligonucleótidos mandados a elaborar 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
CRH	60	25	26
Ciclofilina y G3PDH	64	50	21
ADENOHIPOFISIS	Tm (°C)	pmol/μl	Ciclos
TRH-R1	64	25	26
PPII	55	25	30
Ciclofilina	64	50	20

Tabla 2. Ciclos y condiciones de amplificación para cada gen analizado. Los ciclos varían dependiendo del tejido analizado debido a que la cantidad del RNAm es diferente.

Después de amplificar los genes, se semi-cuantificaron por electroforesis los productos de la PCR. La ciclofilina y la G3PDH se utilizaron como genes control. Se preparó un gel de agarosa al 2% para todos los amplificados (para 75 ml: se usaron 1.5 g de agarosa standard-low, [Biorad], 15 ml de TBE 5X y se aforó a 75 ml con agua milliQ).

Del producto de PCR se tomaron 12 μ l del gen en cuestión, 4 μ l del gen control y se adicionaron 2 μ l del loading buffer (0.025 g de azul de bromofenol, 0.025 g de xileno cyanol, 5 ml de glicerol) para teñir el cDNA. Posteriormente se realizó la semi-cuantificación de los genes por densitometría utilizando el programa de American Applied Biotechnology.

Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford.

Se diluyeron 10 μ l de suero de rata en 100 μ l de agua destilada. De esta dilución se tomaron por duplicado alícuotas de 10 μ l para la determinación de proteínas. Se preparó una curva estándar por duplicado con las siguientes concentraciones: 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 μ l (1 μ g/ μ l BSA). Se adicionó a todos los tubos 5 ml del colorante (Bio-Rad), se dejaron todos los tubos reposando durante 5 min y se realizó la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a 595 nm.

Ensayo enzimático inmunométrico de leptina (ELISA).

Para cuantificar la concentración sérica de leptina se utilizó el kit colorimétrico de leptina marca CALBIOCHEM. Este kit utiliza un anticuerpo policlonal para la leptina, el cual está inmovilizado en la placa para unir la leptina presente en 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 siguiente 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 depositaron 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 estándar del 1 al 7 en los pozos correspondientes, la concentración de la leptina en la curva estándar fue la siguiente: 6,400; 3,200;

1,600; 800; 400; 200 y 100 pg/ml, respectivamente. Posteriormente se depositaron las muestras (25 μ l de suero más 75 μ l de buffer de ensayo) en los pozos correspondientes, se agitó ligeramente la placa, y se incubó durante una hora a 37°C. Después de la incubación se lavó la placa 10 veces adicionando 200 μ l de la solución de lavado y posteriormente se aspiró el contenido de los pozos. Se adicionaron 100 μ l del anticuerpo de conejo contra la leptina de ratón en todos los pozos excepto en el blanco y se incubó la placa durante 30 min a 37°C. Se lavó nuevamente la placa 10 veces adicionando 200 μ l de la solución de lavado y se aspiró el contenido de la placa. Posteriormente, se adicionó 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 incubó la placa durante 30 min a temperatura ambiente; para detener la reacción se adicionó a cada pozo 100 μ l de una solución de ácido sulfúrico 1 N en agua. Posteriormente se realizó la lectura en el espectrofotómetro 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. La sensibilidad del ensayo es de 4.76 pg/ml.

Radioinmunoensayo de Corticosterona.

Se utilizaron 4 μ l de suero diluido en 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.

Se preparó una curva estándar como sigue: 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) 500 μ l; en los tubos NSB (unión no específica) 500 μ l + 100 μ l amortiguador fosfatos; y en los tubos T (cuentas totales), 600 μ l. Todos los tubos se incubaron a 98°C durante 10 min 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 a

todos los tubos 100 μl de la corticosterona tritiada (1 μl ^3H -Corticosterona + 9 ml buffer diluyente= 10,000 cpm/100 μl). Se mezclaron los tubos con un vórtex y se incubaron durante 24 h a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 200 μl 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.

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. Este ensayo tiene un límite de detección de 5 pg; y una variabilidad de 8% inter-ensayo y 7% intra-ensayo.

Radioinmunoensayo para TSH y Prolactina.

Para cuantificar la concentración sérica de TSH y de prolactina se empleó el protocolo y materiales de la NIDDK (National Hormone and Pituitary Program). Para TSH se utilizaron 50 μl de suero de rata diluidos 1:3 en amortiguador RIA (la sensibilidad del ensayo es de 5 pg, con un coeficiente de variabilidad inter-ensayo del 13% e intra-ensayo del 6%); y para prolactina se empleó 50 μl de suero de rata sin diluir (la sensibilidad del ensayo es de 15 pg, con un coeficiente de variabilidad inter e intra-ensayo del 5%).

La curva estándar (por triplicado) se preparó de la siguiente manera: a los tubos NSB se adicionó 300 μl de amortiguador RIA (amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.5 + 150 mM NaCl + 0.25% BSA + 50 mM EDTA), a los tubos Bo se adicionó 200 μl del amortiguador RIA y 100 μl de Ab contra TSH o prolactina. Posteriormente, se preparó la curva estándar con 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 pg/200 μl de amortiguador RIA y se adicionó 100 μl de Ab contra TSH o prolactina. También se preparó una curva con suero de ratas controles (eutiroides). Se prepararon tubos con 10, 25, 50, 100 y 200 μl de suero, se completaron a 200 μl con amortiguador RIA y se adicionó 100 μl de Ab contra TSH o prolactina.

A las muestras problema se les adicionó 100 μ l de Ab contra TSH o prolactina, y se completó a un volumen final de 300 μ l con amortiguador RIA.

Posteriormente se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente durante 18-24 h. Terminado el tiempo de incubación, se adicionó a todos los tubos 100 μ l de 125 I-TSH o prolactina (10,000 cpm) y se incubaron de nuevo a temperatura ambiente entre 18 y 24 h. 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 h. 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 realizó la lectura de cada tubo en un contador gamma.

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

Radioinmunoensayo de Hormonas Tiroideas.

Para cuantificar la concentración sérica de T_3 y T_4 se utilizaron los kits "Coat-A-Count total T_3 " y "Coat-A-Count total T_4 ", respectivamente, de la marca DPC. El antisuero de ambos kits son altamente específicos para estas hormonas, con una reactividad cruzada del 100% para la T_3 y la T_4 , y extremadamente baja con otros compuestos que se encuentran de manera natural en las muestras. Ambos kits son radioinmunoensayos de fase sólida donde la T_3 y T_4 total marcadas con 125 I, compiten durante un tiempo fijo con la hormona presente en la muestra del animal por sitios de unión con el anticuerpo.

Radioinmunoensayo de T₃.

Se marcaron cuatro tubos de ensayo: 2 T y 2 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 ¹²⁵I T₃ a todos los tubos y se agitaron en vórtex. Se incubaron los tubos durante 2 h a 37°C en baño maría. Después de la incubación se decantaron por completo los tubos excepto los T. Finalmente se cuantificaron las muestras en el contador gamma durante 1 min. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de T₃, utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en ng/dl. La sensibilidad del ensayo es de 7 ng/dl.

Radioinmunoensayo de T₄.

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. 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. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de T₄ utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en µg/dl. La sensibilidad del ensayo es de 0.25 µg/dl.

Radioinmunoensayo de Estradiol.

Para cuantificar la concentración sérica de estradiol se utilizó el kit "Ultra-Sensitive Estradiol RIA" de la marca DSL. Todos los tubos se prepararon por duplicado. Se adicionaron 200 μ l de los estándares, controles y muestras problema (suero de rata) a los tubos previamente marcados. Posteriormente se añadió a todos los tubos (excepto T y NSB) 100 μ l de antisuero contra estradiol. Se agitaron los tubos en el vórtex y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Pasado el tiempo de incubación se adicionaron a todos los tubos 100 μ l de estradiol marcado con 125 I. Se agitaron los tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Se adicionó 1 ml del reactivo para la precipitación a todos los tubos excepto a los T. Se agitaron en el vórtex y se dejaron reposando a temperatura ambiente durante 20 min, se centrifugaron todos los tubos (excepto los T) durante 20 min a 1,500 x g. Se decantaron los tubos excepto los T, y se introdujeron en un contador gamma durante 1 min. Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de estradiol utilizando el Software "enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se expresan en pg/ml. La sensibilidad del ensayo es de 2.2 pg/ml.

Prueba de Enterramiento Defensivo: Un Modelo de Ansiedad.

Para determinar si los animales con restricción alimentaria forzada o con anorexia por deshidratación se encuentran ansiosos, se realizó la prueba de enterramiento defensivo, paradigma utilizado para evaluar conductas relacionadas a la ansiedad (Treit et al., 1981; De Boer y Koolhaas, 2003).

Debido a que se ha reportado previamente que las ratas que ingieren una solución salina al 2.5% desarrollan anorexia a partir del segundo día (Watts et al., 1999), se sometieron los tres grupos (controles, RA y AN) a la prueba de enterramiento defensivo el tercer día de iniciado el experimento.

La prueba consiste en poner la rata en una caja de acrílico con aproximadamente 5 cm de aserrín y un electrodo en un extremo de la misma, cuando el animal entra en contacto con este electrodo ocurre una descarga eléctrica de 0.3 mA. La prueba dura 10 min y se lleva a cabo en un cuarto oscuro, la prueba es videograbada para poder realizar posteriormente los análisis.

El comportamiento de ansiedad se registra de acuerdo a los siguientes parámetros (Treit et al., 1981):

- a) Latencia de enterramiento (LE): tiempo registrado desde el inicio de la prueba hasta que la rata empieza a enterrar el electrodo por primera vez. Es una medida de reactividad.
- b) Tiempo de enterramiento (TE): tiempo total o acumulado que la rata emplea para enterrar el electrodo durante los 10 min de la prueba. Es la medida directa de ansiedad, en la que a mayor tiempo de enterramiento mayor ansiedad.
- c) Número total de choques recibidos antes y después de empezar a enterrar el electrodo.

Análisis de resultados

Se obtuvo para todos los datos la media y el error estándar de la media (EEM). 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). Y para el experimento de cinética y los experimentos del frío se usaron un análisis de varianza de dos vías también seguido por la prueba post-hoc de Fisher. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando la $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS

INGESTA DE ALIMENTO Y LÍQUIDO.

El grupo de la AN a lo largo del experimento tuvo acceso ilimitado al alimento y líquido. En cambio al grupo de la RA se le restringió el alimento, ofreciéndoles la misma cantidad que consumía el grupo de la AN; la figura 1 muestra los valores de 6 experimentos independientes. A pesar de que el grupo de la AN tuvo acceso ilimitado al alimento, su consumo disminuyó significativamente desde el primer día vs el control (AN: 8 ± 0.5 g, C: 13 ± 0.54 g), para el séptimo día su consumo de alimento ya había disminuido un 83% vs el control (AN: 2.4 ± 0.54 g, C: 13.8 ± 0.7 g; $F_{(2,93)} = 286.21$, $p < 0.0001$) (**Fig. 1A**). Para el séptimo día la ingesta energética disminuyó significativamente en un 82 y en un 84% en la RA y la AN, respectivamente vs el grupo control (C: 104.45 ± 3 , RA: 17 ± 1.4 , AN: 17.7 ± 1.6 Kcal/kg de peso corporal; $F_{(2,112)} = 546.92$, $p < 0.0001$) (**Tabla 3**).

En cuanto a la ingesta de líquido, ésta disminuyó significativamente desde el primer día en el grupo de la RA, y para el séptimo día su ingesta de líquido disminuyó a un 55%. En cambio el grupo de la AN aumentó significativamente su ingesta de líquido desde el primer día hasta el séptimo, aumentando a un 153% vs el control (RA: 36 ± 2 ml, AN: 99 ± 8 ml, C: 64 ± 4 ml; $F_{(2,93)} = 67.2$, $p < 0.0001$) (**Fig. 1B**).

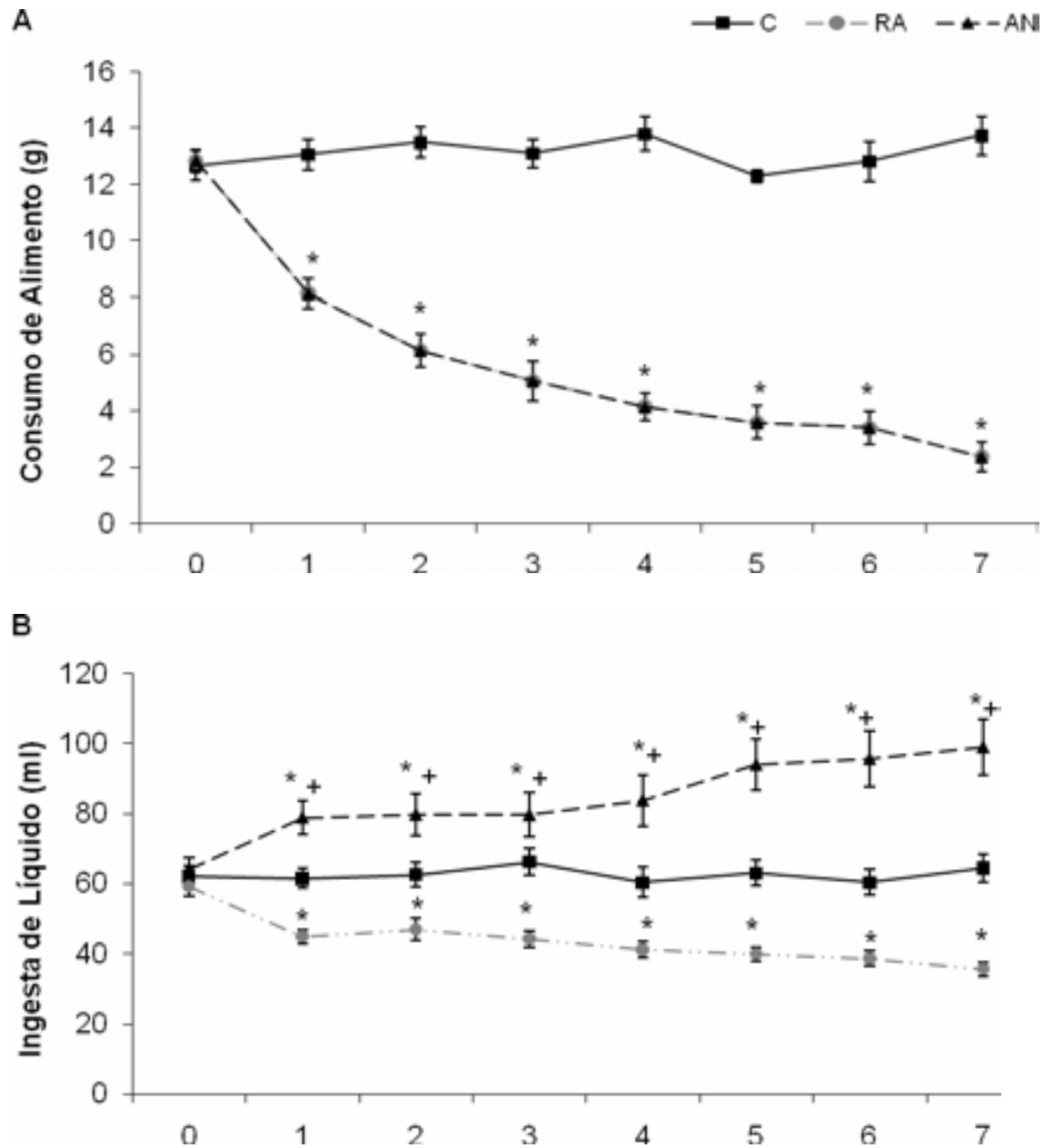
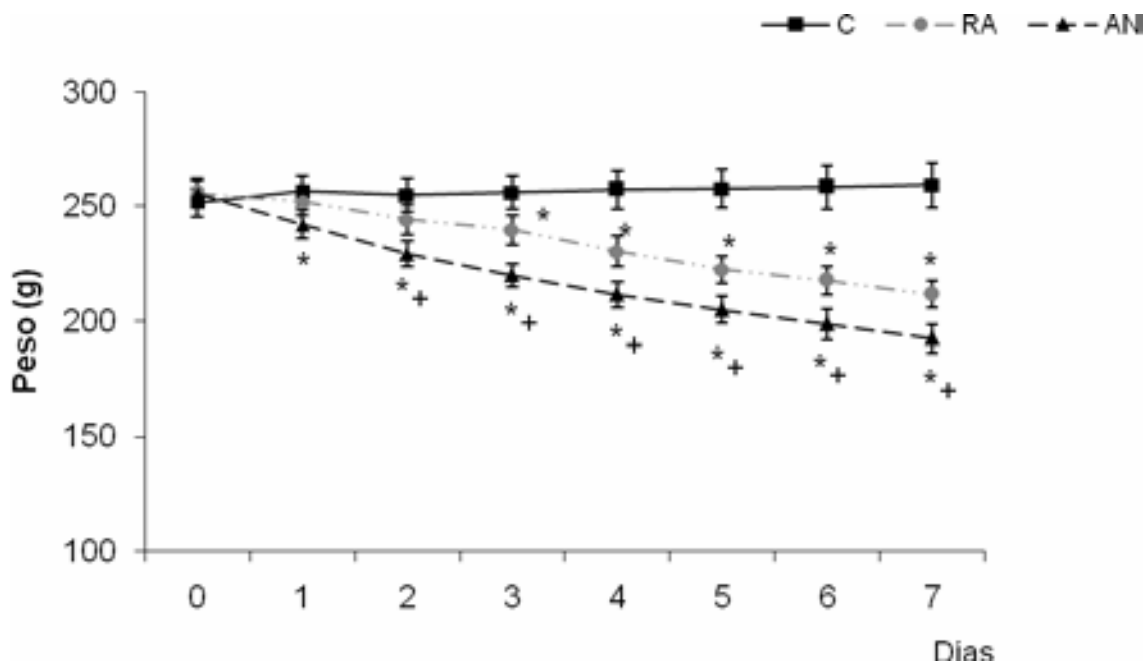


Figura 1. Consumo de alimento (A) e ingesta de líquido (B) durante los 7 días del experimento. Los resultados muestran la media \pm EEM ($n = 8/\text{grupo/experimento}$; 6 experimentos independientes); los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida por la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando * $p < 0.05$ vs C, + vs RA.

CAMBIOS EN EL PESO CORPORAL.

Tanto los animales de la RA como los de la AN perdieron peso durante el experimento, sin embargo el grupo de la AN tuvo una mayor pérdida de peso que los animales con RA. El grupo de la RA perdió peso significativamente a partir del cuarto día, y para el séptimo día la pérdida de peso fue del 18%. En cambio el grupo de la AN perdió peso significativamente desde el primer día del experimento, y para el séptimo día ya había perdido un 26% de peso con respecto al control (RA: 212 ± 6 g, AN: 193 ± 6.2 g, C: 260 ± 10 g; $F_{(2,93)} = 76.02$, $p < 0.0001$) (Fig. 2).



Fi

Figura 2. Cambios en el peso corporal durante los 7 días del experimento. Los resultados muestran la media \pm EEM ($n = 8/\text{grupo/experimento}$; 6 experimentos independientes); los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguida por la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos, considerándose significativa cuando * $p < 0.05$ vs C, + vs RA.

CINÉTICA DE CAMBIOS EN EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDEO.

Para poder determinar en qué momento de la anorexia por deshidratación se presentan cambios significativos en la regulación del eje tiroideo, se sacrificaron a los animales en el día 1, 3, 5 y 7. Ya se sabe que en condiciones donde se presenta un balance energético negativo, el eje tiroideo se inhibe (Blake et al., 1991; Rondeel et al., 1995; van Hassteren et al., 1995; 1996). En el grupo de la RA se encontraron los cambios esperados: los niveles del RNAm de pro-TRH del NPV disminuyeron significativamente desde el día 5, y para el día 7 la expresión de pro-TRH disminuyó a un 52%; en cambio en el grupo de la AN los niveles del RNAm de pro-TRH del NPV aumentaron significativamente desde el día 5, y para el día 7 la expresión de pro-TRH aumentó un 36% [Día 7, C: $100 \pm 13\%$, RA: $48 \pm 11\%$, AN: $136 \pm 7\%$; el ANOVA de dos vías solamente mostró diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,28)} = 10.5$, $p < 0.001$)] (**Fig. 3A**).

La concentración sérica de TSH en la RA no presentó cambios significativos, en cambio en el grupo de la AN la concentración de TSH aumentó significativamente vs el C y la RA desde el día 5, y para el día 7 la concentración de esta hormona había aumentado un 46% (**Fig. 3B**) [el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,36)} = 8.45$, $p < 0.001$) y una diferencia significativa entre la interacción de grupos y tiempos de sacrificio ($F_{(6,36)} = 4.04$, $p < 0.01$)]. La concentración sérica de T_4 disminuyó en el día 7 en la RA vs el C, mientras que en el grupo de la AN no se encontraron cambios significativos (**Fig. 3C**) [el ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre la RA y el grupo control en el día 7 ($F_{(2,8)} = 6.5$, $p < 0.05$); el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre los tiempos de sacrificio ($F_{(3,34)} = 6.18$, $p < 0.001$)]. La concentración sérica de T_3 disminuyó significativamente en los dos grupos experimentales, desde el día 5 en la RA y desde el día 3 en la AN, y para el día 7 la concentración sérica de T_3 había disminuido un 39% en la RA y un 30% en la AN (**Fig. 3D**) [el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,36)} = 13.93$, $p < 0.0001$), y tiempos de sacrificio ($F_{(3,36)} = 14.78$, $p < 0.0001$)].

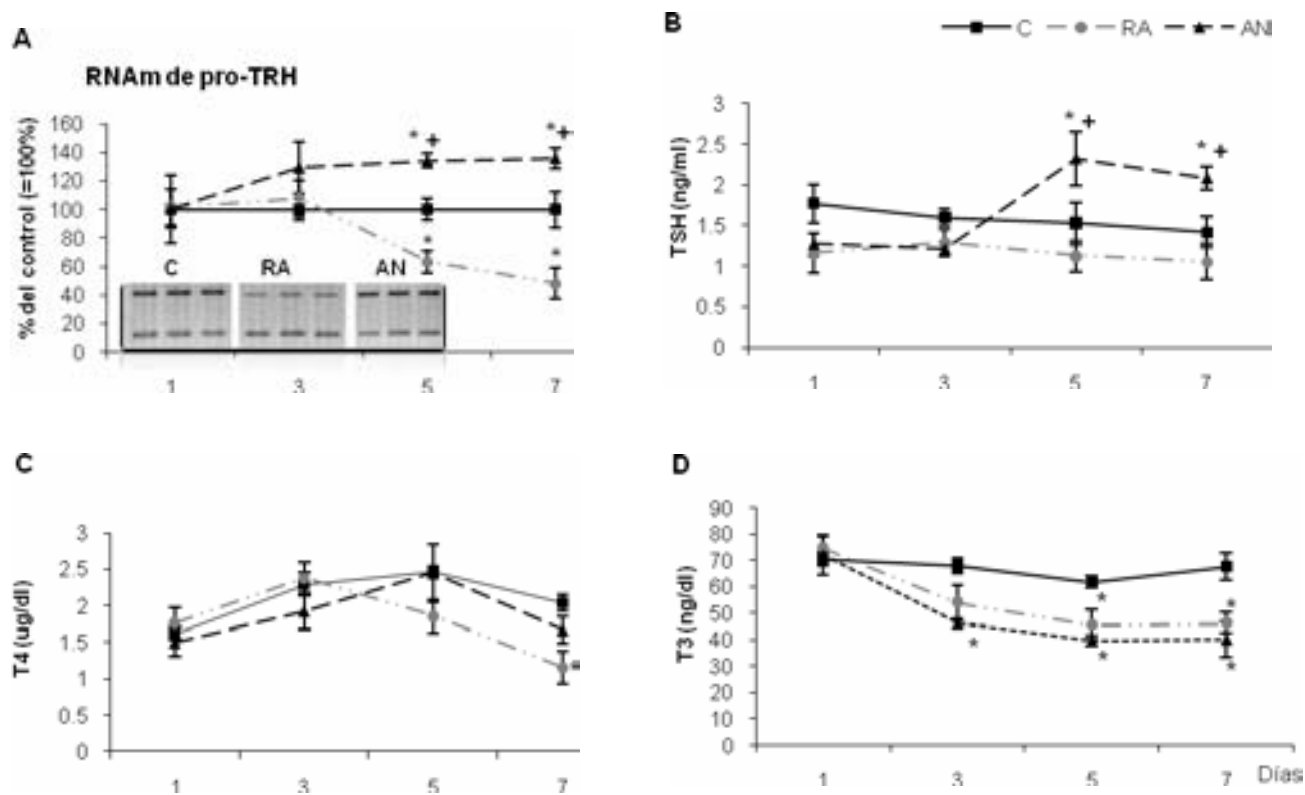


Figura 3. Cinética de cambios en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo. Los animales fueron sacrificados después de 1, 3, 5 y 7 días de iniciado el experimento (n= 4 ratas/grupo/experimento). Los datos se presentan como el promedio \pm EEM en % del promedio del grupo control. Los valores del RNAm de pro-TRH en el NPV están calculados con el cDNA de pro-TRH/ciclofilina. En el panel (A) se muestra un gel representativo de los cDNAs de los grupos C, RA y AN; banda superior= pro-TRH, banda inferior= ciclofilina. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías, seguido por la prueba post-hoc de Fisher, se consideró una diferencia significativa cuando * $p < 0.05$ vs C, + vs RA.

La concentración sérica de corticosterona aumentó significativamente en la RA a partir del día 5 (C: 350 ± 44 , RA: 471 ± 20 ng/ml), mientras que en la AN la concentración de corticosterona aumentó desde el día 3 (C: 365 ± 43 , AN: 537 ± 24 ng/ml), para el séptimo día, la concentración sérica de corticosterona en la AN era mayor comparada con el control y la RA (C: 332 ± 16 , RA: 454 ± 22 , AN: 543 ± 18 ng/ml), [el ANOVA de dos vías solamente mostró diferencias significativas entre grupos ($F_{(2,36)} = 24.18$, $p < 0.0001$)] (Fig. 4).

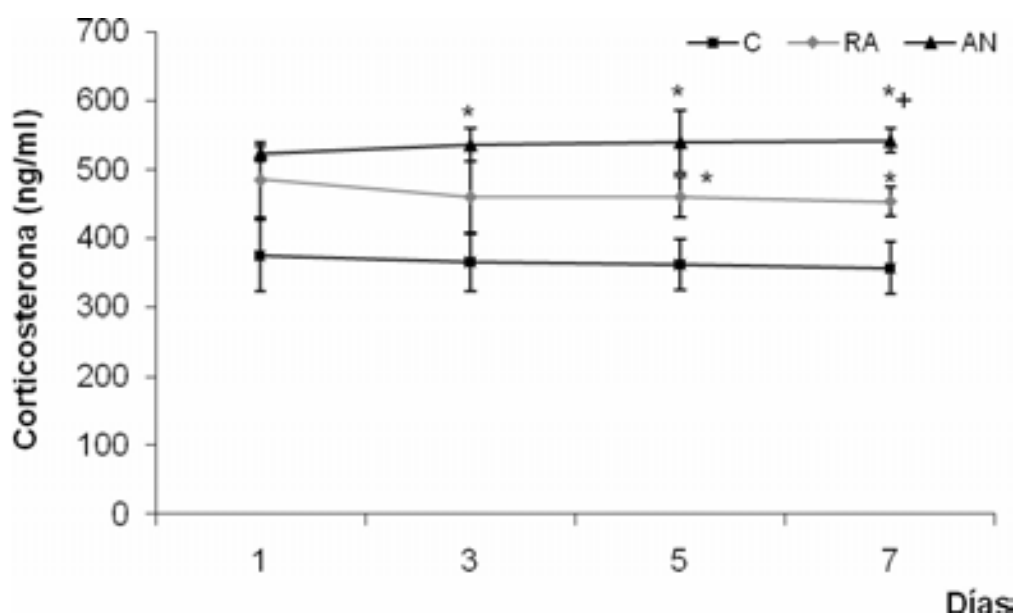


Figura 4. Cinética de cambios en la concentración sérica de corticosterona. Los animales fueron sacrificados después de 1, 3, 5 y 7 días de iniciado el experimento (n= 4 ratas/grupo/experimento). Los valores se presentan en ng/ml. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías, seguido por la prueba post-hoc de Fisher, se consideró una diferencia significativa cuando * $p < 0.05$ vs C, + vs RA.

CAMBIOS DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDEO AL SÉPTIMO DÍA.

Debido a que la mayoría de los cambios significativos encontrados en el eje HHT se observaron hasta el día 7, en los experimentos posteriores los animales fueron sacrificados al séptimo día. Se llevaron a cabo 6 experimentos independientes con una $n = 4-8$.

Se pesó el tejido adiposo blanco y pardo inmediatamente después de que los animales fueron sacrificados. Ambos grupos experimentales tuvieron una pérdida significativa del tejido adiposo blanco ($F_{(2,27)} = 4.012$, $p < 0.05$), mientras que no hubo cambios significativos en el peso del tejido adiposo pardo (**Tabla 3**). La concentración sérica de proteínas no cambió significativamente en ningún grupo experimental (**Tabla 3**).

También se cuantificaron distintas hormonas que participan en la regulación del eje tiroideo. La concentración de leptina y estradiol disminuyeron significativamente tanto en la RA como en la AN (leptina: $F_{(2,43)} = 45.4$, $p < 0.0001$; estradiol: $F_{(2,25)} = 11.75$, $p = 0.001$) (**Tabla 3**). Mientras que la concentración de corticosterona aumentó en ambos grupos experimentales como se esperaba ($F_{(2,20)} = 26.8$, $p < 0.0001$) (**Tabla 3**).

Adicionalmente se semi-cuantificó la expresión de pro-CRH del NPV como control de reproducibilidad para evaluar la respuesta a la RA y a la AN (Watts et al., 1999). La expresión de pro-CRH disminuyó de igual manera en la RA y en la AN (**Tabla 3**).

Para evaluar la respuesta del eje tiroideo a la restricción alimentaria forzada y a la anorexia inducida por deshidratación se analizaron distintos parámetros del mismo. Se semi-cuantificó por RT-PCR el RNAm de pro-TRH y su receptor tipo 1 (TRH-R1) en el NPV, y el contenido de este péptido en el hipotálamo dorsal (HD) y en el hipotálamo medio basal (HMB) por RIA. Los niveles de RNAm de pro-TRH en el NPV disminuyeron significativamente en la RA, mientras que en la AN aumentaron (RA: $55 \pm 4\%$, AN: $131 \pm 8\%$, C: $100 \pm 5\%$; $F_{(2,45)} = 36.76$, $p < 0.0001$). En cambio, los niveles del RNAm de TRH-R1 en el NPV solamente disminuyeron significativamente en el grupo de la RA (RA: $68 \pm 6\%$, AN: $89 \pm 4\%$, C: $100 \pm 9\%$; $F_{(2,37)} = 5.62$, $p < 0.01$) (**Fig. 5A**). El contenido de TRH en el HMB aumentó significativamente en la RA, y en el grupo de la AN se observó una tendencia a disminuir pero no alcanzó significancia estadística (RA: $148 \pm 9\%$, AN: $76 \pm 4\%$, C: $100 \pm 12\%$; $F_{(2,14)} = 8.02$, $p < 0.01$) (**Fig. 5A**). No se encontraron cambios significativos en el contenido de TRH del HD.

En la adenohipófisis, los niveles del RNAm de TRH-R1 aumentaron significativamente en el grupo de la RA vs el control, mientras que en la AN solamente se observó una disminución comparado con la RA (RA: $150 \pm 18\%$, AN: $66 \pm 11\%$, C: $100 \pm 16\%$; $F_{(2,32)} = 7.99$, $p < 0.001$) (**Fig. 5B**). En cambio los niveles del RNAm de la PPII no cambiaron significativamente en ningún grupo experimental.

La concentración sérica de TSH disminuyó significativamente en el grupo de la RA, mientras que aumentó en el de la AN (RA: $68 \pm 5\%$, AN: $155 \pm 11\%$, C: $100 \pm 6\%$; $F_{(2,114)} = 32.04$, $p < 0.0001$). La concentración sérica de T_4 y T_3 disminuyeron significativamente tanto en la RA como en la AN vs el control (T_4 : $F_{(2,55)} = 20.04$, $p < 0.0001$; T_3 : $F_{(2,50)} = 25.14$, $p < 0.0001$).

La concentración sérica de prolactina disminuyó significativamente un 80% en la RA comparado con el grupo control y la AN ($F_{(2,20)} = 26.82$, $p < 0.0001$) (**Tabla 3**).

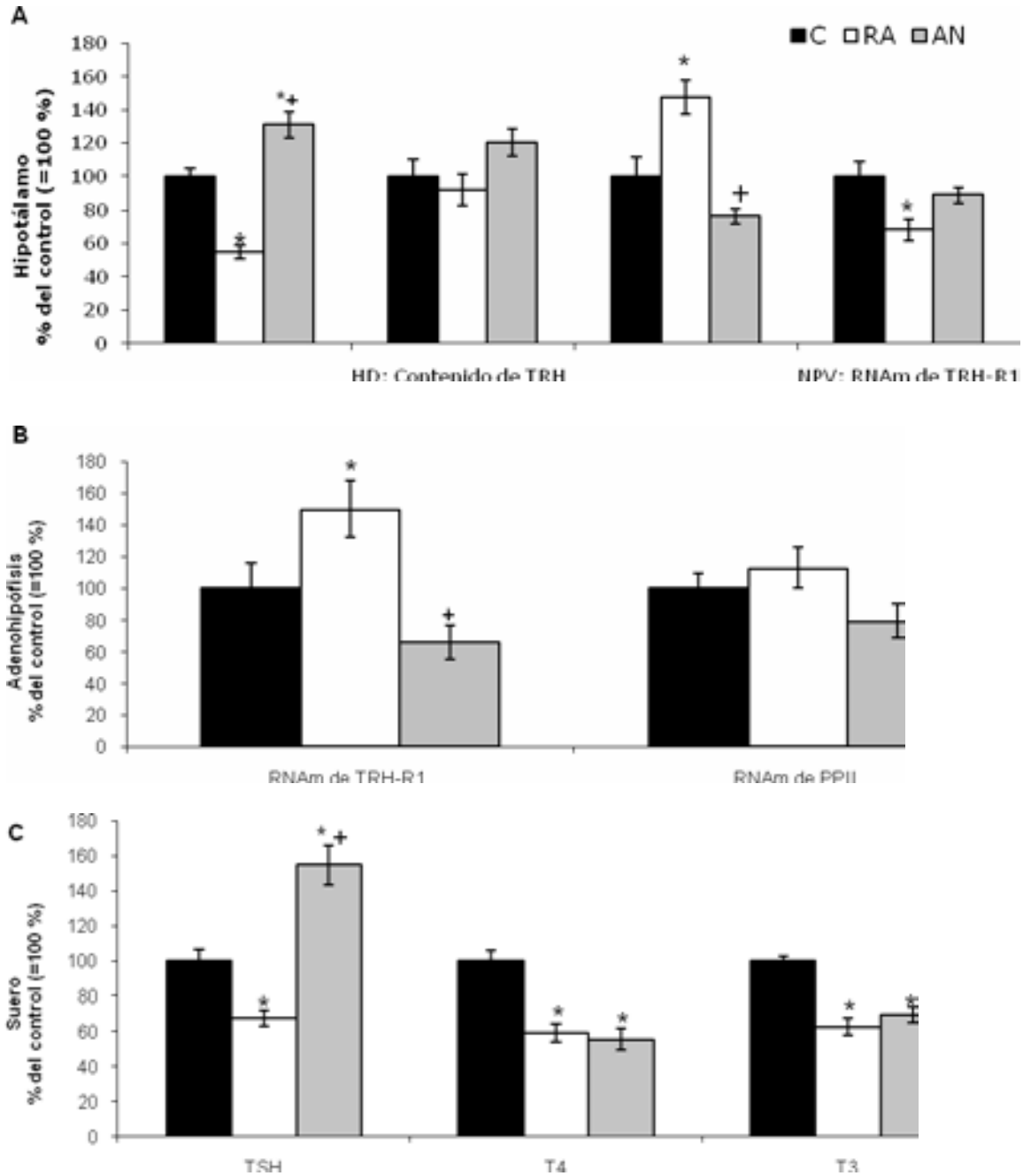


Figura 5. Cambios del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo al séptimo día. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM en % del promedio del grupo control. Los valores del RNAm de pro-TRH, TRH-R1 y PPII ya sea en el NPV o adenohipófisis están calculados con el cDNA del gen de estudio/ciclofilina. (A) RNAm de pro-TRH y TRH-R1 en el NPV (n= 16), contenido de TRH en el hipotálamo dorsal (HD) y en el hipotálamo mediobasal (HMB) (n= 8). (B) RNAm de TRH-R1 y de PPII en adenohipófisis (n= 10). (C) Concentración sérica de tirotropina (TSH), T₃ y T₄ total (TSH, C: 2.1 \pm 0.22 ng/ml, n=40; T₄, C: 1.94 \pm 0.27 μ g/dl, n=19; T₃, C: 73 \pm 4.7 ng/dl, n=19). Los datos se analizaron con un ANOVA de una vía, seguido por la prueba post-hoc de Fisher, se consideró una diferencia significativa cuando * p<0.05 vs C, + vs RA.

	Control	Restricción Alimentaria Forzada	Anorexia inducida por Deshidratación
Energía consumida (kcal/kg de peso/día)	104 ± 3	17 ± 1.4 ^a	17.7 ± 1.6 ^a
Peso corporal (g)	260 ± 10	212 ± 6 ^a	193 ± 6 ^{a, b}
TAB (g/kg)	22 ± 2	16 ± 2 ^a	17 ± 1 ^a
TAP (g/kg)	1.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Proteína (µg/ml)	133 ± 2.5	123 ± 4.5	130 ± 4.6
RNAm de pro-CRH (% del control)	100 ± 10	81 ± 4 ^a	80 ± 4 ^a
Leptina (% del control) (425 ± 33 pg/ml)	100 ± 8	33 ± 4 ^a	37 ± 5 ^a
Corticosterona (% del control) (151 ± 15 ng/ml)	100 ± 7	263 ± 23 ^a	218 ± 17 ^a
Estradiol (% del control) (26 ± 4 pg/ml)	100 ± 13	40 ± 9 ^a	31 ± 6 ^a
Prolactina (% del control) (0.97 ± 0.09 ng/ml)	100 ± 9	20 ± 4 ^a	101 ± 9 ^b

Tabla 3. Efectos de la restricción alimentaria forzada y la anorexia inducida por deshidratación en el día 7. Todos los animales fueron sacrificados en el día 7, los datos de todos los experimentos se calcularon como el % del grupo control (= 100% y expresado como la media ± EEM). La energía consumida se calculó considerando que el alimento ofrecido a los animales provee 3.04 Kcal/g; las Kcal consumidas fueron normalizadas por Kg de peso corporal. El tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo pardo (TAP) fueron pesados (g) y normalizados por los kg de peso corporal. Las hormonas séricas fueron cuantificadas por radioinmunoensayo (RIA). Número de determinaciones analizadas para calcular los datos presentados: energía consumida y peso corporal n= 35; leptina n= 17; corticosterona n= 8; determinaciones restantes n= 10. Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía seguido por la prueba post-hoc de Fisher, se consideraron diferencias significativas cuando p<0.05; (a) diferencia significativa vs control, y (b) vs RA.

RESPUESTA NEUROENDÓCRINA A LA EXPOSICIÓN AL FRÍO.

El séptimo día de iniciado el experimento, se seleccionaron al azar 5 ratas de cada grupo para someterlas a un estrés agudo antes de ser sacrificadas. Los animales se introdujeron a un cuarto frío a 4°C durante una hora.

El peso de la grasa blanca y de la grasa parda no varió después de la exposición al frío, sin embargo como en experimentos anteriores, el peso de la grasa blanca disminuyó significativamente en los animales con RA y AN que permanecieron a temperatura ambiente (RA: 8 ± 0.8 , AN: 7 ± 0.7 , C: 15 ± 1.8 g/kg; el ANOVA de dos vías solamente mostró una diferencia significativa entre grupos $F_{(2,57)} = 11$, $p < 0.0001$).

Por otro lado, se reprodujeron los cambios en el metabolismo TRHérgico descritos anteriormente en los animales que se mantuvieron a temperatura ambiente. La expresión de pro-TRH del NPV disminuyó un 46% en el grupo de la RA y aumentó un 47% en el grupo de la AN (RA: $54 \pm 4\%$, AN: $147 \pm 10\%$, C: $100 \pm 6\%$) (**Fig. 6A**).

En las ratas controles expuestas al frío durante 1 hora se observó el esperado aumento en la expresión de pro-TRH que ha sido reportado anteriormente (Uribe et al., 1993; Sánchez et al., 20001; 2007). También se observó un aumento significativo en los niveles del RNAm de TRH en las ratas con RA expuestas al frío, mientras que en el grupo de la AN no se observó una respuesta aditiva de las neuronas TRHérgicas ante el estímulo del frío (**Fig. 6B**) [el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre los grupos expuestos al frío ($F_{(2,42)} = 3.76$, $p < 0.05$), entre diferentes condiciones de temperatura ($F_{(1,42)} = 42.21$, $p < 0.0001$), e interacción entre estas dos variables ($F_{(2,42)} = 29.06$, $p < 0.0001$)].

La concentración sérica de TSH solamente aumentó significativamente en el grupo control expuesto al frío vs su propio control (animales mantenidos a temperatura ambiente) (**Fig. 6B**) [el ANOVA de dos vías solamente mostró una diferencia significativa entre los grupos ($F_{(2,21)} = 8.39$, $p < 0.001$)]. Por el contrario, la concentración sérica de T_4 aumentó significativamente en todos los animales expuestos al frío, observándose un mayor incremento en el grupo de la AN vs la RA; en

cambio la concentración sérica de T_3 aumentó igual en el grupo de RA y AN expuestos al frío, sin presentarse un cambio significativo en el grupo control expuesto al frío (**Fig. 6B**) [T_4 : el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,18)}= 130.83$, $p<0.0001$), diferentes condiciones de temperatura ($F_{(1,18)}= 63.64$, $p<0.0001$), e interacción ($F_{(2,18)}= 8.14$, $p<0.01$; $n= 4$); T_3 : el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre grupos ($F_{(2,16)}= 34.01$, $p<0.0001$), y diferentes condiciones de temperatura ($F_{(1,16)}= 58.69$, $p<0.0001$), la interacción de estas dos variables no fue significativa; $n= 4$].

La concentración sérica de corticosterona aumentó significativamente en todos los grupos de animales expuestos al frío comparado a los animales mantenidos a temperatura ambiente (**Fig. 6B**) [el ANOVA de dos vías mostró una diferencia significativa entre los grupos ($F_{(2,23)}= 13.02$, $p<0.001$), diferentes condiciones de temperatura ($F_{(1,23)}= 57.71$, $p<0.0001$), e interacción entre estas dos variables ($F_{(2,23)}= 6.83$, $p<0.05$)].

Como se esperaba, no se encontraron cambios significativos en la concentración sérica de prolactina en los animales expuestos al frío vs los animales mantenidos a temperatura ambiente (**Fig. 7**), ya que el frío estimula únicamente la liberación de las hormonas tiroideas, pero no la de prolactina (Sánchez et al., 2007).

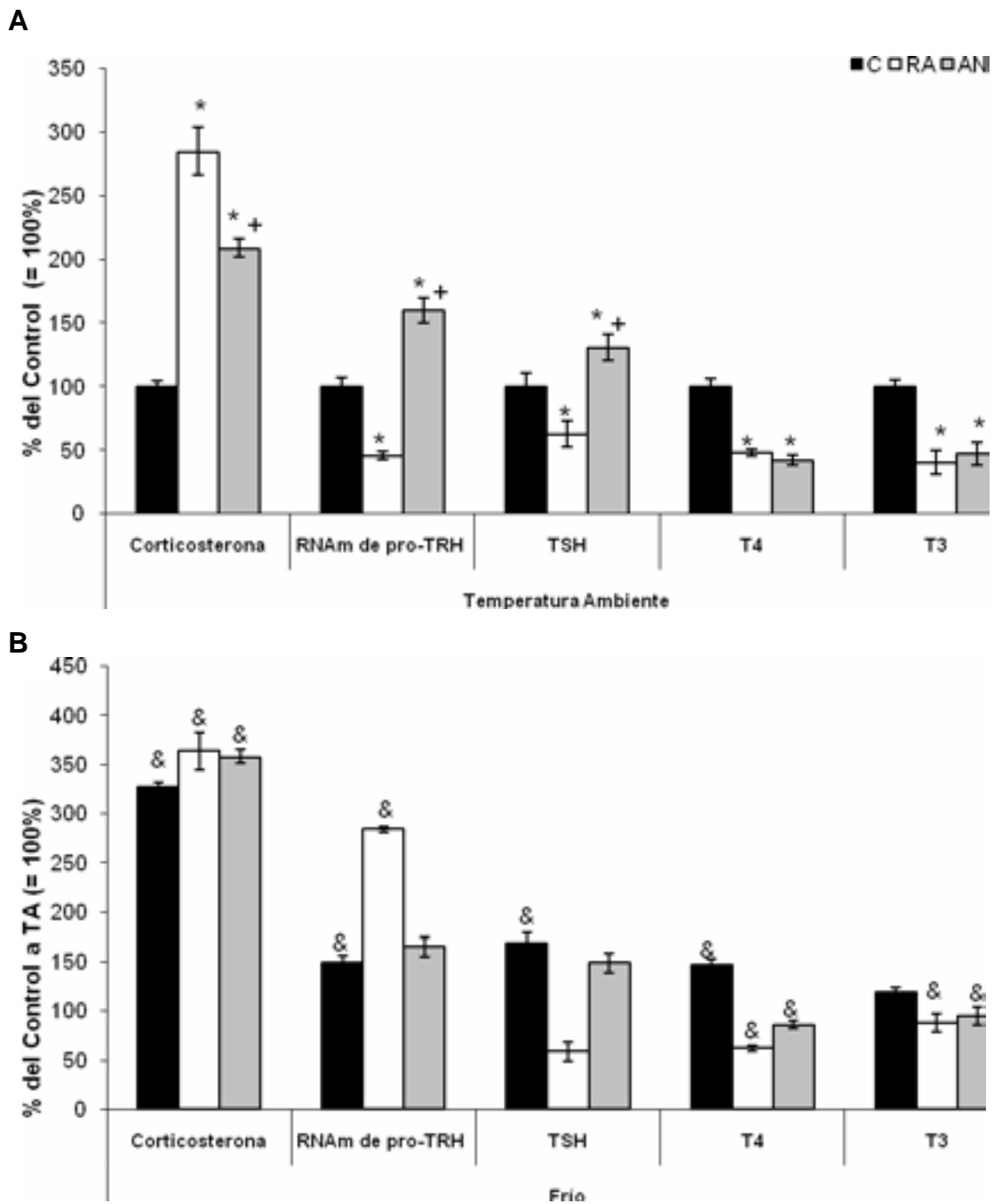


Figura 6. Respuesta Neuroendócrina a la Exposición al Frío. Diez ratas por grupo fueron sometidas a un paradigma de restricción alimentaria forzada o a una anorexia inducida por deshidratación, el séptimo día, 5 animales/grupo se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) y las otras 5 se expusieron a 4°C durante una hora antes de ser sacrificadas. Los datos se presentan como el promedio \pm EEM en % del promedio del grupo control mantenido a TA. Los valores del RNAm de pro-TRH del NPV están calculados con el cDNA de pro-TRH/ciclofilina. Corticosterona: C-TA= 145 ± 7 ng/ml, n= 5; TSH: C-TA= 1.5 ± 0.17 ng/ml, n= 5; T₄: C-TA= 2.3 ± 0.14 μ g/dl, n= 4; T₃: C-TA= 86 ± 5 ng/dl, n= 4. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA de dos vías seguido por la prueba post-hoc de Fisher, considerándose significativo cuando la $p < 0.05$ * vs Control-TA; + vs RA-TA; & vs su propio control mantenido a TA.

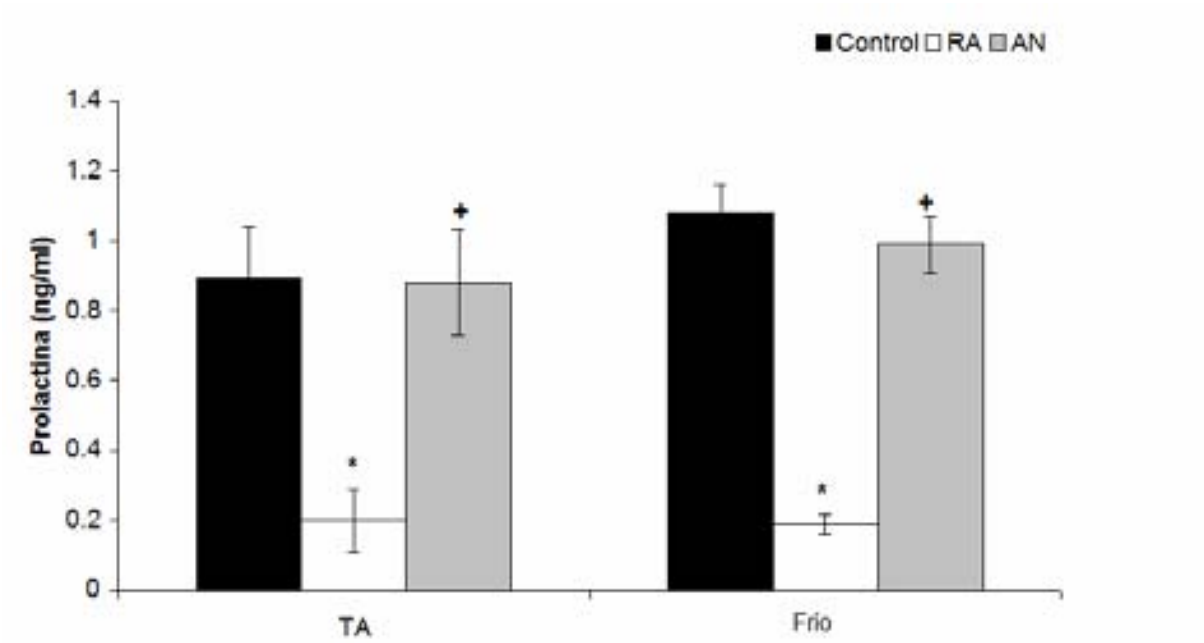


Figura 7. Cuantificación de Prolactina sérica el día 7 en el experimento del Frío. Diez ratas por grupo se sometieron a una restricción alimentaria forzada o a una anorexia inducida por deshidratación, el séptimo día, 5 animales/grupo se mantuvieron a temperatura ambiente (TA) y las otras 5 se expusieron a 4°C durante una hora antes de ser sacrificadas. Los datos se presentan en ng/ml ± EEM. Los datos se analizaron con un ANOVA de dos vías, seguido por la prueba post-hoc de Fisher, se consideró una diferencia significativa cuando * $p < 0.05$ vs control; + vs RA.

PRUEBA DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO: MODELO DE ANSIEDAD.

En las ratas con AN expuestas al frío, no se observó una respuesta aditiva a este estímulo como en el caso de la RA, a pesar de que en ambos grupos experimentales hubo una respuesta disminuida a la liberación de corticosterona. Por lo tanto, se analizó si esto podría deberse a una respuesta diferencial ante el estrés.

Para evaluar conductas de ansiedad en las ratas, se utilizó la prueba de enterramiento defensivo. Los grupos de RA y AN para el tercer día de iniciado el experimento ya habían disminuido significativamente su consumo de alimento (RA-forzado y AN-voluntario) en un 39%, y la concentración sérica de T_3 estaba disminuido sin todavía haber cambios significativos en la expresión de pro-TRH (**Fig.3**), por lo tanto se seleccionó este día para someter a todos los grupos de animales a la prueba de enterramiento defensivo.

La latencia (tiempo en que el animal tarda en enterrar el electrodo a partir del primer choque), que representa la reactividad del animal ante un estímulo desagradable, disminuyó de igual manera en la RA y la AN comparado con el control (C: 90 ± 14 , RA: 52 ± 4 , AN: 51 ± 6.6 seg [$F_{(2,26)}= 5.74$, $p<0.01$]) (**Fig. 8A**). El tiempo de enterramiento, que refleja la ansiedad en el animal, fue mayor en la AN vs el control; el grupo de la RA mostró una tendencia a aumentar el tiempo de enterramiento pero no fue significativo (C: 151 ± 17 , RA: 199 ± 24 , AN: 247 ± 21 seg [$F_{(2,26)}= 4.83$, $p= 0.01$]) (**Fig. 8B**). El número de choques fue el mismo en los tres grupos (C: 3 ± 0.4 , RA: 3 ± 0.4 , AN: 3 ± 0.5 choques [$F_{(2,26)}= 0.27$, $p= 0.75$]) (**Fig. 8C**). Estos datos sugieren que las diferencias en los parámetros conductuales se deben a la ansiedad que presenta el animal, y que los animales con RA y AN presentaban un mayor grado de ansiedad que los animales controles en el momento que se realizó la prueba; sin diferencia aparente entre ambos grupos experimentales.

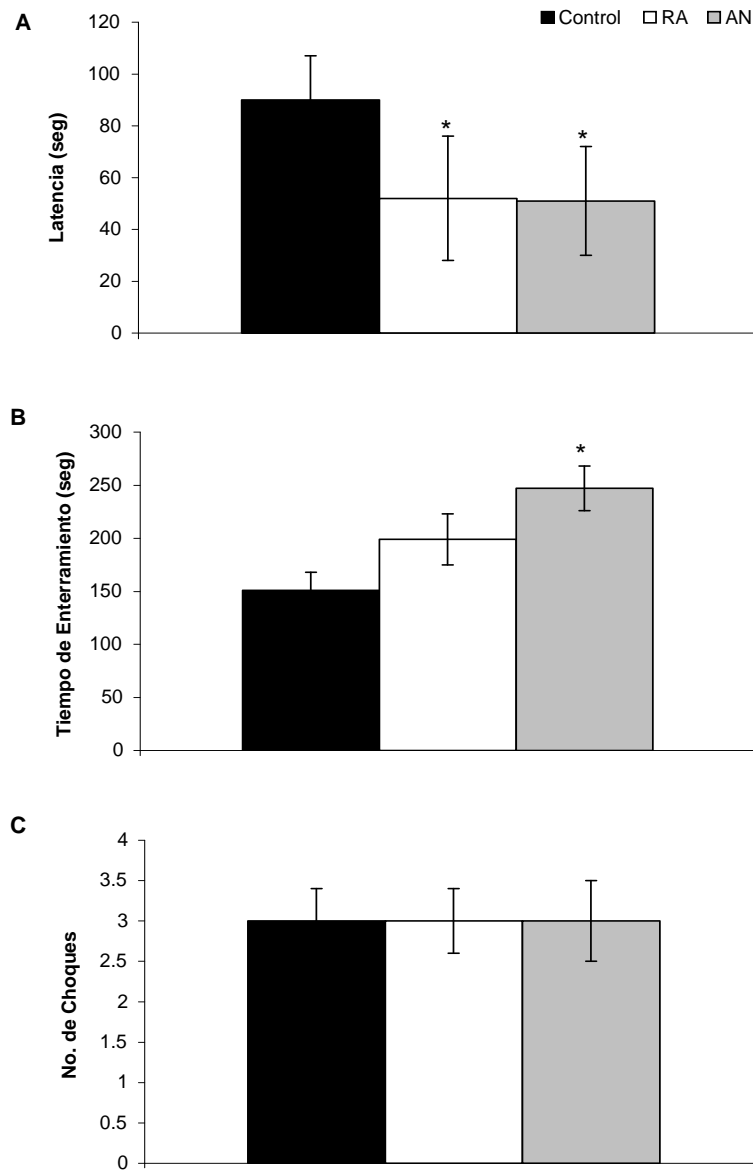


Figura 8. Prueba de Enterramiento Defensivo: Modelo de Ansiedad. Los grupos control, RA y AN fueron sometidos a la prueba de enterramiento defensivo para evaluar conductas de ansiedad. Esta prueba se llevó a cabo el tercer día de iniciado el experimento cuando los grupos experimentales habían disminuido significativamente su consumo de alimento en un 39%. La prueba se llevó a cabo en un cuarto oscuro, tuvo una duración de 10 min y fue videograbada para analizar posteriormente los diferentes parámetros. (A) Latencia, tiempo en que tarda el animal en enterrar el electrodo a partir del primer choque, representa la reactividad del animal ante un estímulo desagradable. (B) Tiempo de enterramiento, tiempo acumulativo en que el animal pasa enterrando el electrodo a lo largo de la prueba, refleja la ansiedad del animal. (C) Número de choques, cantidad de choques que recibe el animal a lo largo de la prueba. Los datos fueron analizados con un ANOVA de una vía seguido por la prueba post-hoc de Fisher, se consideró una diferencia significativa cuando * $p < 0.05$ vs control.

VII. DISCUSIÓN

El SNC juega un papel fundamental en el control del metabolismo energético y en la regulación de la conducta alimentaria. Diferentes vías neuronales hipotalámicas a través de la integración de señales periféricas (como hormonas y nutrimentos) y de señales neuronales provenientes del sistema límbico regulan la ingesta de alimentos y el gasto energético (Berthoud, 2002; Horvath et al., 2004). Uno de estos núcleos hipotalámicos de importancia es el NPV, que integra señales de distintos tipos (neuronales y periféricas) provenientes del ARC, del hipotálamo lateral, de la corteza prefrontal, de regiones del sistema límbico y del tallo cerebral para generar una respuesta endócrina y conductual (Berthoud, 2002; Wynne, 2005; Watts et al., 2007). El NPV participa en el control de la ingesta de alimentos a través de la regulación de procesos metabólicos, de la digestión y absorción de nutrimentos; además está involucrado en cambios en la ingesta de alimentos inducido por el estrés (Berthoud, 2002).

Durante los últimos años se han desarrollado diversas herramientas, como estudios anatómicos y de modificación genética, técnicas electrofisiológicas, farmacológicas y conductuales, para manipular y estudiar los mecanismos moleculares y celulares que regulan la homeostasis energética y la conducta alimentaria.

En nuestro laboratorio para determinar si existía una regulación diferencial en el funcionamiento del Eje HHT entre el modelo de restricción alimentaria forzada (RA) y el de restricción alimentaria voluntaria (anorexia inducida por deshidratación, AN). Analizamos los cambios y la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo en ambos modelos, y posteriormente estudiamos la respuesta neural TRHérgica del NPV ante un estímulo agudo (el frío) cuando los animales presentan una restricción energético-proteica.

Las ratas sometidas a la restricción alimentaria forzada (RA) y a la anorexia inducida por deshidratación (AN, restricción voluntaria) presentaron los mismos cambios metabólicos reportados previamente en ratas machos (Watts et al., 1999), tales como pérdida de peso corporal y de tejido adiposo blanco, disminución de la concentración sérica de leptina y aumento de corticosterona, así como una disminución en la expresión de pro-CRH del NPV (Watts et al., 1999).

En cambio, se encontró una regulación diferencial del eje HHT entre la RA y la AN. En la RA, como se ha reportado previamente (Blake et al., 1991; van Haasteren et al., 1995; 1996; de Gortari et al., 2000), se presentó un hipotiroidismo terciario: La concentración sérica de TSH, T₃ y T₄ disminuyeron, al igual que la expresión de pro-TRH en el NPV, mientras que el contenido de TRH en el hipotálamo medio basal aumentó (eminencia media), lo cual sugiere una inhibición de la liberación hipotalámica de TRH, apoyado por el aumento en la expresión de TRH-R1 en la adenohipófisis. Estos cambios que se presentaron en la RA son generados en respuesta a la disminución de la concentración circulante de leptina (Nillni et al., 2000; Harris et al., 2001) y al aumento de la concentración sérica de corticosterona (Kakucska et al., 1995; Alkemade et al., 2005), los cuales son inducidos a su vez por la restricción calórica. En cambio, en la AN no se observaron estos cambios adaptativos del eje HHT ante la restricción calórica voluntaria, por el contrario, estas ratas desarrollaron un hipotiroidismo de tipo primario: la concentración sérica de TSH aumentó comparado con el control y la RA, pero las concentraciones de T₃ y T₄ disminuyeron, además la expresión de pro-TRH en el NPV aumentó y el contenido de TRH en el hipotálamo medio basal disminuyó, sugiriendo un aumento de la liberación hipotalámica del péptido vs la RA.

Esta regulación diferencial de las neuronas TRHérgicas observado entre la RA y la AN no pudo ser el resultado de la disminución de la concentración sérica de leptina y/o del aumento de la concentración de la corticosterona, ya que estas dos hormonas cambiaron igual en ambos grupos experimentales. La leptina, hormona sintetizada en el tejido adiposo blanco, puede estimular la expresión del gen de TRH directamente a través de la activación de sus receptores (ObRb) localizados en las neuronas TRHérgicas del NPV (Nillni et al., 2000; Harris et al., 2001; Fekete et al., 2000), 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 y de NPY (Fekete et al., 2000; Harris et al., 2001). Por el otro lado, la corticosterona inhibe la síntesis de pro-TRH en el NPV (Kakucska et al., 1995; Alkemade et al., 2005) 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).

Existen otros péptidos hipotalámicos sintetizados en el ARC que son regulados por la concentración circulante de leptina, como el NPY (el cual inhibe la expresión de TRH) y la POMC (precursor del α -MSH, el cual estimula la expresión de TRH), como se mencionó anteriormente. Sin embargo, el aumento de la síntesis de TRH en el NPV en la AN no puede atribuirse tampoco a estos neuropéptidos, ya que se regulan igual tanto en la RA como en la AN: aumenta la expresión de NPY y disminuye la de POMC en el ARC (Watts et al., 1999).

Estos resultados sugieren que en la AN debe existir un diferente mecanismo de regulación. Un posible elemento que podría estar involucrado es una regulación diferencial en la actividad hipotalámica de la desiodasa II (DII) entre la RA y la AN, esta desiodasa regula la síntesis local de T_3 , la cual puede modular a su vez la expresión de pro-TRH en el NPV. En condiciones de ayuno, la disminución de la concentración de leptina y el aumento de la corticosterona regulan la DII hipotalámica, aumentando su actividad y expresión (Bianco et al., 2002; Coppola et al., 2005). Otro estudio ha revelado que la inyección i.c.v. de un lipopolisacárido bacteriano (LPS) a ratas, induce un aumento en la expresión de DII en el hipotálamo medio basal, y es independiente a la concentración sérica de las hormonas tiroideas y de los glucocorticoides (Fekete et al., 2005). Por lo tanto, se propone que la regulación diferencial en la actividad de la DII en hipotálamo puede ser responsable de las diferencias encontradas entre la RA y la AN en la expresión hipotalámica de TRH.

Otro posible mecanismo neuronal que proponemos podría estar implicado en el aumento de la expresión de pro-TRH en el NPV en las ratas con AN es a través del pro-CRH del hipotálamo lateral. Watts y cols. (1999) observaron por hibridación *in situ*, que la expresión de pro-CRH en el hipotálamo lateral aumenta exclusivamente en las ratas con anorexia durante 5 días de deshidratación y no cambia en la RA, además este aumento se relaciona con el grado de anorexia que presentan los animales; y las neuronas CRHérgicas del hipotálamo lateral tienen proyecciones hacia el NPV (Watts et al., 1999), a su vez, este núcleo hipotalámico expresa el receptor tipo 2 del CRH (CRH-R2, el cual media la acción anorexigénica del CRH) y se ha demostrado previamente que el RNAm de CRH-R2 disminuye específicamente en la AN (Jaimes, 2006); y la inyección de un antagonista específico para CRH-R2 (Antisauvagina-30) en el NPV evita el aumento de la síntesis de TRH en los animales con

anorexia por deshidratación (Mancera, 2007). Adicionalmente, la inyección de CRH en el NPV en las ratas inhibe la ingesta de alimento inducida por el NPY (Menzaghi et al., 1993; Heinrichs et al., 1993); y resultados preliminares de nuestro laboratorio han revelado que *in vitro*, el CRH puede aumentar la síntesis de TRH en células hipotalámicas. No podemos descartar entonces que el CRH del hipotálamo lateral sea un efector del TRH en el NPV en éste modelo animal de anorexia, ya que otros péptidos en el ARC, como el NPY, POMC (que afectan la expresión de TRH del NPV) y neurotensina cambian de igual manera en la AN y la RA (Watts et al., 1999) como se mencionó anteriormente.

El TRH ejerce sus acciones a través de la activación de sus receptores (TRH-R1 y R2), los cuales son regulados de manera diferencial por el péptido dependiendo del paradigma utilizado y de la estructura límbica estudiada (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008; de Gortari et al., 2006; 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 significativa de los niveles del RNAm de TRH-R1 del NPV, mientras que en la AN no se observaron cambios significativos. La regulación de este receptor observado en la RA podría deberse a la acción del TRH proveniente de otras estructuras hipotalámicas que tienen proyecciones hacia el NPV, como por ejemplo el hipotálamo lateral, el ARC y el núcleo dorsomedial (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; por ejemplo, una restricción alimentaria del 50% durante 12 días disminuye la síntesis de TRH en HDM (Lindblom et al., 2005). Se ha sugerido que esta estructura hipotalámica podría estar involucrada 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.

Cuando el TRH es liberado de la eminencia media en el hipotálamo, viaja por el sistema portahipofisiario para ejercer su acción en la adenohipófisis a través de su receptor tipo 1 (inhibiendo su expresión) (Narayanan et al., 1992; Yu et al., 1998). TRH-R1 también es regulado por hormonas como el estradiol y las hormonas tiroideas, aumentando y disminuyendo respectivamente su expresión (Hinkle et al., 1981; Yamada et al., 1992; Kimura et al., 1994; Schomburg et al., 1995). Los elementos del metabolismo TRHérgico estudiados en la adenohipófisis sugieren que en la AN hubo una liberación hipotalámica normal del TRH, ya que la expresión de TRH-R1 en este grupo experimental fue igual al grupo control, en cambio en la RA la expresión del receptor aumentó comparada con el control y la AN, sugiriendo una inhibición en la liberación de TRH de la eminencia media. Otros resultados que también apoyan una activación del eje tiroideo en la AN y una inhibición en la RA, es que en la AN la concentración sérica de TSH aumentó, mientras que la concentración de prolactina fue normal. En cambio en la RA la concentración sérica de TSH y de prolactina estaban disminuidas comparado con el control y la AN.

RESPUESTA NEUROENDÓCRINA A LA EXPOSICIÓN AL FRÍO.

Después de observar que el eje HHT de los animales con anorexia inducida por deshidratación no presentaron la adaptación típica (hipotiroidismo terciario) que se da en condiciones de una restricción calórica, como en el caso de la RA, decidimos estudiar si esta falta de adaptación podría afectar la respuesta de las neuronas TRHérgicas del NPV y la función del eje tiroideo ante un estímulo agudo como es el frío. Se expusieron a los animales al frío (4°C) durante una hora debido a que es un estímulo que activa el eje HHT: las neuronas TRHérgicas del NPV se activan, aumentando la expresión de pro-TRH y su liberación hipotalámica, lo que lleva a un aumento en la liberación de TSH y de las hormonas tiroideas, sin haber una liberación de prolactina (Arancibia et al., 1996; Pacak et al., 2001; Sánchez et al., 2001; 2007).

A pesar de que el grupo de la RA desarrolló un hipotiroidismo terciario (disminución en la expresión de pro-TRH en el NPV) inducida por la restricción calórica, cuando se sometieron estos animales al frío se observó una respuesta incrementada de las neuronas TRHérgicas, reflejado por un

aumento en los niveles del RNAm de pro-TRH en el NPV. También aumentó la concentración sérica de las hormonas tiroideas vs su respectivo control a temperatura ambiente, lo que sugiere que hay una activación de las neuronas hipofisiotrópicas, sin embargo no podemos descartar la opción de que también haya una activación de las neuronas TRHérgicas localizadas en la zona rostral del NPV, las cuales son neuronas no hipofisiotrópicas, es decir, que no están involucradas en la regulación del eje tiroideo pero que también son estimuladas por el frío (Sánchez et al., 2001).

En cambio cuando el grupo de la AN fue expuesto al frío no se observó un estímulo adicional al que ya existía previamente cuando los animales se encontraban a temperatura ambiente, ya que los niveles del RNAm de pro-TRH en el NPV fueron los mismos comparados con su propio control. Estos datos podrían sugerir que la anorexia inducida por deshidratación altera la respuesta de las neuronas TRHérgicas ante el estímulo del frío evitando una mayor activación. Otra opción que sugerimos, es que la deshidratación no solamente afecta a las neuronas hipofisiotrópicas de TRH, si no que también activa a las neuronas no hipofisiotrópicas del NPV, y por esta razón cuando los animales son expuestos al frío ya no se observa una respuesta aditiva de las neuronas TRHérgicas, lo que apoyaría la participación del TRH en la regulación de la conducta alimentaria en otras zonas del NPV; sin embargo sería necesario llevar a cabo una hibridación *in situ* para poder saber con detalle qué neuronas de TRH del NPV son las que se activan en la AN.

La activación de las neuronas TRHérgicas del NPV por la exposición al frío está mediado por estimulación noradrenérgica (Arancibia et al., 1996). En cultivos de células hipotalámicas, la noradrenalina aumenta la transcripción de TRH, y éste efecto es inhibido por acción de la corticosterona (Cote-Velez et al., 2005). Sin embargo, la falta de una respuesta aditiva de las neuronas de TRH en el NPV que se observó en la AN no puede deberse al aumento de la concentración de corticosterona, ya que los animales controles expuestos al frío presentaron el mayor incremento de este glucocorticoide, y aún así se observó una activación de las neuronas TRHérgicas comparado con su propio control (animales controles en temperatura ambiente).

La concentración sérica de TSH solamente aumentó significativamente en las ratas controles expuestas al frío. En la RA y la AN no se observaron cambios significativos, esto podría deberse a

una respuesta retardada de TSH a la liberación de TRH. También se observó un efecto del frío sobre la concentración sérica de las hormonas tiroideas, sin embargo fue diferente entre grupos. En los tres grupos (C, RA y AN), la exposición al frío estimuló la liberación de T_4 , pero fue mayor en la AN; en cambio la concentración sérica de T_3 solamente aumentó significativamente en la RA y la AN. El frío afecta la actividad de las desiodasas de manera diferencial dependiendo del tejido, estimula la activación de la desiodasa I (DI) en hígado (Reed et al., 1994; Lisboa et al., 2003) y de la DII en tejido adiposo pardo (Silva et al., 1983), mientras que disminuye en la tiroides (Lisboa et al., 2003). Este aumento en la concentración sérica de T_3 que se observa exclusivamente en la RA y la AN después de una hora de exposición al frío podría sugerir una mayor actividad de las desiodasas en estos grupos inducido por la activación del sistema simpático que se presenta en los animales hipotiroideos (Bianco et al., 2005; Silva et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, el frío activa el eje HHT aumentando la liberación de TSH y de las HT, pero no estimula la liberación de prolactina (Sánchez et al., 2007); esto mismo se observó en nuestros animales, los cuáles no presentaron cambios significativos en la concentración sérica de prolactina cuando fueron expuestos al frío durante una hora.

El frío es un estrés agudo de tipo fisiológico que afecta el eje HHA y el eje HHT; sin embargo otros tipos de estrés, como la prueba de enterramiento defensivo, representan un estrés de tipo psicológico que además tiene efectos sobre algunas regiones del sistema límbico (ej. amígdala, hipocampo) y que participan en la regulación del eje adrenal ante un estímulo de estrés (Helmreich et al., 1999; Pacak y Palkovits, 2001; Makino et al., 2002; Mizoguchi et al., 2003; Herman et al., 2005). Se ha observado que un estrés de origen psicológico, como la inmovilización o la prueba de enterramiento defensivo, puede modificar la expresión de TRH (Pacak y Palkovits, 2001; Gutierrez, 2002); por lo tanto, utilizando la prueba de enterramiento defensivo determinamos si existía una diferencia en la conducta de ansiedad entre la RA y la AN; y si esto pudiera participar en la regulación diferencial del funcionamiento del eje tiroideo entre estos dos grupos. Se ha reportado previamente que la prueba de enterramiento defensivo induce un aumento en la síntesis de TRH en el hipotálamo y una disminución de su contenido en la eminencia media (Gutierrez-Mariscal, 2008). Por lo tanto,

estos datos y los reportados en este trabajo sugieren que la ansiedad que presentan estos animales no está participando en la regulación diferencial del eje HHT observado entre la RA y la AN, ya que ambos grupos tuvieron el mismo grado de ansiedad, que fue mayor comparado con el control, pero no fue diferente entre la RA y la AN.

VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

Las neuronas TRHérgicas del NPV, así como el funcionamiento del eje tiroideo se regulan de manera diferencial en la RA (hipotiroidismo terciario) y la AN (hipotiroidismo primario) a pesar de que tuvieron una deficiencia energética similar y de que presentaron los mismos cambios metabólicos. Estos datos muestran que la anorexia inducida por deshidratación genera un efecto específico en las neuronas TRHérgicas del NPV, ya que ante la exposición al frío no hubo un mayor estímulo en la expresión de pro-TRH del NPV en los animales con AN. Si esto pudiera deberse a que la anorexia por deshidratación estimula tanto las neuronas hipofisiotrópicas como las no hipofisiotrópicas antes de que los animales sean sometidos al frío falta por ser definido.

Es importante aclarar, que el modelo animal de anorexia que presentamos en este trabajo no necesariamente refleja todas las alteraciones que se observan en las pacientes con Anorexia Nervosa, sin embargo, la falta de adaptación del eje HHT observado en nuestros animales muestra la misma alteración endócrina que se desarrolla en las pacientes con esta enfermedad, y podría ser la base para explicar los riesgos que podrían presentar estos pacientes cuando hay una pérdida importante de peso.

Entre mejor entendamos las bases neurobiológicas de la conducta alimentaria y del gasto energético, tendremos mejores posibilidades para desarrollar tratamientos farmacológicos para diferentes enfermedades como la anorexia y/o la obesidad.

IX. REFERENCIAS.

Aguilar-Valles A., Sánchez E., de Gortari P., Balderas I., Ramirez-Amaya V., Bermudez-Rattoni F., Joseph-Bravo P., 2005. Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 82, 306-319.

Ahima R.S., Prabakaran D., Mantzoros C., 1996. Role of leptin in the neuroendocrin response to fasting. *Nature* 382, 250-252.

Ahima R.S., Kelly J., Elmquist J.K., Flier J.S., 1999. Distinct physiologic and neuronal responses to decreased leptin and mild hyperleptinemia. *Endocrinology* 140, 4923-4931.

Ahima R.S. and Osei Y., 2004. Leptin Signaling. *Physiol. Behav.* 81, 223-241.

Alkemade A., Unmehopa U.A., Wiersinga W.M., Swaab D.F., Fliers E., 2005. Glucocorticoids decrease thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 323-327.

Arancibia S., Tapia-Arancibia L., Astier H., Assenmacher I., 1989. Physiological evidence for alpha 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci. Lett.* 100, 169-174.

Arancibia S., Rage F., Astier H., and Tapia-Arancibia L., 1996. Neuroendocrin and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* 64, 257-267.

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

Bauer K., Carmeliet P., Schulz M., Baes M., Deneff C., 1990. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 127, 1224-1233.

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

Bauer K., Schomburg L., Heuer H., Schäfer M.K., 1999. Thyrotropin releasing hormone (TRH), the TRH-receptor and the TRH-degrading ectoenzyme; three elements of a peptidergic signalling system. *Results Probl. Cell. Differ.* 26, 13-42.

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

Bernardis L.L., Bellinger L.L., 1996. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20, 189-287.

Berthoud H.R., 2002. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 393-428.

Berthoud H.R., 2004. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol. Behav.* 81, 781-793.

Bi S., Ladenheim E.E., Schwartz G.J., Moran T.H., 2001. A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R254-260.

Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen, P.R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38-89.

Bianco A.C., Maia, A.L., da Silva W.S., Christoffolete M.A., 2005. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci. Rep.* 25, 191-208.

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

Blake N.G., Eckland D.J., Foster O.J., Lightman S.L., 1991. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129, 2714-2718.

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

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

Bowers C.Y., Friesen H.G., Hwang P., Guyda H.J., Folkers K., 1971. Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl prolinamide. *Biochem. Res. Commun.* 45, 1033-1041.

Bradford M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brady L.S., Smith M.A., Gold P.W., Herkenham M., 1990. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52, 441-447.

Brambilla F., Santonastaso P., Caregato L., Favaro A., 2006. Disorders of eating behavior: correlation between hypothalamo-pituitary-thyroid function and psychopathological aspects. *Psychoneuroendocrinology* 31, 131-136.

Bray G.A., Gallagher T.F. Jr., 1975. Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 54, 301-330.

Bray G.A., 2000. Afferent signals regulating food intake. *Proc. Nutr. Soc.* 59, 373-384.

Broberger C., 1999. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain. Res.* 848, 101-113.

Broberger C., Hökfelt T., 2001. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol. Behav.* 74, 669-682.

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

Cai X.J., Widdowson P.S., Harrold J., Wilson S., Buckingham R.E., Arch J.R., Tadayyon M., Clapham J.C., Wilding J., Williams G., 1999. Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48, 2132-2137.

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

Campbell R.E., Smith M.S., Allen S.E., Grayson B.E., French-Mullen J.M., Grove K.L., 2003. Orexin neurons express a functional pancreatic polypeptide Y4 receptor. *J. Neurosci.* 23, 1487-1497.

Carvalho S.D., Kimura E.T., Bianco A.C., Silva J.E., 1991. Central role of brown adipose tissue thyroxine 5'-deiodinase on thyroid hormone-dependent thermogenic response to cold. *Endocrinology* 128, 2149-2159.

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

Chalmers D.T., Lovenberg T.W., De Souza E.B., 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 6340-6350.

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

Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Chrousos G.P., 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuroendocrine and target tissue-related causes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 Suppl. 2, S50-S55.

Cintra A., Bortolotti F., 1992. Presence of strong glucocorticoid receptor immunoreactivity within hypothalamic and hypophyseal cells containing pro-opiomelanocortin peptides. *Brain Res.* 577, 127-133.

Cizza G., Brady L.S., Pacak K., Blackman M.R., Gold P.W., Chrousos G.P., 1995. Stress-induced inhibition of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis is attenuated in the aged Fischer 344/N male rat. *Neuroendocrinology* 62, 506-513.

Cone R.D., Cowley M.A., Butler A.A., Fan W., Marks D.L., Low M.J., 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25 Suppl 5:S63-67.

Connan F., Campbell I.C., Katzman M., Lightman S.L., Treasure J., 2003. A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol. Behav.* 79, 13-24.

Coppola A., Meli R., Diano S., 2005. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146, 2827-2833.

Cote-Velez A., Perez-Martinez L., Diaz-Gallardo M.Y., Perez-Monter C., Carreon-Rodriguez A., Charli J.L., Joseph-Bravo P., 2005. Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 177-197.

Cowley M.A., Pronchuk N., Fan W., Dinulescu D.M., Colmers W.F., Cone R.D., 1999. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24, 155-163.

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

Dahl G.E., Evans N.P., Thrun L.A., Karsch F., 1994. A central negative feedback action of thyroid hormones on thyrotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 135, 2392-2397.

Danielson P.E., Forss-Petter S., Brow M.A., Calavetta L., Douglass J., Milner R.J., Sutcliffe J.G., 1988. p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DN*; 7, 261-267.

De Boer S.F., Koolhaas J.M., 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 145-161.

de Gortari P., González-Alzati M.E., Cisneros M., Joseph-Bravo P., 2000. 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.* 3, 255-265.

de Gortari P., Uribe R M., Garcia-Vazquez A., Aguilar-Valles A., Martinez A., Valdes A., Charli J.L., Fernandez-Guardiola A., Joseph-Bravo P., 2006. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem. Int.* 48, 31-42.

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

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

de Lecea L., Kilduff T.S., Peyron C., Gao X., Foye P.E., Danielson P.E., Fukuhara C., Battenberg E.L., Gautvik V.T., Bartlett F.S., Frankel W.N., van den Pol A.N., Bloom F.E., Gautvik K.M., Sutcliffe J.G., 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95, 322-327.

Elmqvist J.K., Ahima R.S., Maratos-Flier E., Flier J.S., Saper C.B., 1997. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138, 839-842.

Elmqvist J.K., Bjørbaek C., Ahima R.S., Flier J.S., Saper C.B., 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 395, 535-547.

Elmqvist J.K., Elias C.F., Saper C.B., 1999. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221-232.

Fekete C., Légrádi G., Mihály E., Huang Q.H., Tatro J.B., Rand W.M., Emerson C.H., Lechan R.M., 2000. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J. Neurosci.* 20, 1550-1558.

Fekete C., Kelly J., Mihaly E., Sarkar S., Rand W.M., Legradi G., Emerson C.H., Lechan, R.M., 2001. Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142, 2606-2613.

Fekete C., Sarkar S., Rand W.M., Harney J.W., Emerson C.H., Bianco A.C., Beck-Sickinger A., Lechan R.M., 2002. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 143, 4513-4519.

Fekete C., Marks D.L., Sarkar S., Emerson C.H., Rand W.M., Cone R.D., Lechan R.M., 2004. Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. *Endocrinology* 145, 4816-4821.

Fekete C., Sarkar S., Christoffolete M.A., Emerson C.H., Bianco A.C., Lechan R.M., 2005. Bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced type 2 iodothyronine deiodinase (D2) activation in the mediobasal hypothalamus (MBH) is independent of the LPS-induced fall in serum thyroid hormone levels. *Brain Res.* 1056, 97-99.

Fischer W.H., Spiess J., 1987. Identification of a mammalian glutamyl cyclase converting glutamyl into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 84, 3628-3632.

Fjeldheim A-K., Hovring P.I., Loseth O-P., Johansen P.W., Glover J.C., Matre V., Olstand O.K., Reppe S., Gordeladze J.O., Walaas S.I., Gautvik K.M., 2005. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1 and prothyrotropin-releasing hormone mRNA expression in the central nervous system are regulated by suckling in lactating rats. *Eur. J. Endocrinol.* 152, 791-803.

Fox S.R., Harlan R.E., Shivers B.D., Pfaff D.W., 1990. Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology* 51, 276-283.

Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80, 1523-1631.

Friedman T.C., Yanovski J.A., Jayasvasti V., Yanovski S.Z., Koenig R.J., Wilk S., 1995. Pyroglutamyl peptidase-II ("Thyroliberinase") activity in human serum: influence of weight and thyroid status. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1086-1089.

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

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

Gibbs .J, Young R.C., Smith G.P., 1973. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 84, 488-495.

Giraud S.Q., Billington C.J., Levine A.S., 1998. Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Res.* 809, 302-306.

Griffiths E.C., 1985. Thyrotropin releasing hormone: endocrine and central effects. *Psychoneuroendocrinology* 10, 225-235.

Grosvenor C.E. and Mena F., 1980. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107, 863-868.

Gutiérrez-Mariscal M., de Gortari P., López-Rubalcava C., Martínez A., Joseph-Bravo, P., 2008. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 33, 198-213.

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

Hagan M.M., Rushing P.A., Benoit S.C., Woods S.C., Seeley R.J., 2001. Opioid receptor involvement in the effect of AgRP- (83-132) on food intake and food selection. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R814-821.

Hamamura M., Leng G., Emson P.C., Kiyama H., 1991. Electrical activation and c-fos mRNA expression in rat neurosecretory neurons after systemic administration of cholecystokinin. *J. Physiol.* 444, 51-63.

Harris M., Aschkenasi C., Elias C.F., Chandrankunnel A., Nillni E.A., Bjorbaek C., Elmquist J.K., Flier J.S., Hollenberg A.N., 2001. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.* 107, 111-120.

Havel P.J., 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 226, 963-977.

Heinrichs S.C., Menzaghi F., Pich E.M., Hauger,R.L., Koob G.F., 1993. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* 611, 18-24.

Helmreich D.L., Watkins L.R., Deak T., Maier S.F., Akil H., Watson S.J., 1999. The effect of stressor controllability on stress-induced neuropeptide mRNA expression within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 11, 121-128.

Herman J.P., Ostrander M.M., Mueller N.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1201-1213.

Heuer H., Ehrchen J., Bauer K., Schafer M.K., 1998. Region-specific expression of thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur. J. Neurosci.* 10, 1465-1478.

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

Hinkle P.M., Perrone M.H., Schonbrunn A., 1981. Mechanism of thyroid hormone inhibition of thyrotropin-releasing hormone action. *Endocrinology* 108, 199-205.

Hinkle P.M., Pekary A.E., Senanayaki S., Sattin A., 2002. Role of TRH receptors as possible mediators of analeptic actions of TRH like peptides. *Brain Res.* 935, 59-64.

Hisano S., Fukui Y., Chikamori-Aoyama M., Aizawa T., Shibasaki T., 1993. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive- and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 620, 343-346.

Hollenberg A.N., Monden T., Flynn T.R., Boers M.E., Cohen O., Wondisford F.E., 1995. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone response elements. *Mol. Endocrinol.* 9, 540-550.

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

Horvath T.L., Diano S., van den Pol A.N., 1999. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci.* 19, 1072-1087.

Horvath T.L., Diano S., Tschöp M., 2004. Brain circuits regulating energy homeostasis. *Neuroscientist* 10, 235-246.

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

Jaimes E.L., 2006. Efecto en la Anorexia por deshidratación en la expresión de los genes de TRH, CRH y sus receptores en el sistema límbico de rata. UNAM, Facultad de Química.

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

Jirikowski G.F., Merchenthaler I., Rieger G.E., Stumpf W.E., 1986. Estradiol target sites immunoreactive for beta-endorphin in the arcuate nucleus of rat and mouse hypothalamus. *Neurosci Lett.* 65, 121-126.

Joseph-Bravo P., Loudes C., Charli J.L., Kordon C., 1979. Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res.* 166, 321-329.

Joseph-Bravo P., Uribe R.M. Vargar M.A., Pérez-Martínez L., Zoeller T., 1998. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol. Neurobiol.* 18, 231-247.

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

Kalra S.P, Dube M.G., Sahu A., Phelps C.P., Kalra P.S., 1991. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 10931-10935.

Kamegai J., Minami S., Sugihara H., Hasegawa O., Higuchi H., Wakabayashi I., 1996. Growth hormone receptor gene is expressed in neuropeptide Y neurons in hypothalamic arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* 137, 2109-2112.

Karydis I. and Tolis G., 1998. Orexis, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid* 8, 947-950.

Kay-Nishiyama C., Watts A.G., 1999. Dehydration modifies somal CRH immunoreactivity in the rat hypothalamus: an immunocytochemical study in the absence of colchicine. *Brain. Res.* 822 (1-2):251-255.

Kim M.S., Rossi M., Abusnana S., Sunter D., Morgan D.G., Small C.J., Edwards C.M., Heath M.M., Stanley S.A., Seal L.J., Bhatti J.R., Smith D.M., Ghatei M.A., Bloom S.R., 2000. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49, 177-182.

Kimura N., Arai K., Sahara Y., Suzuki H., Kimura N., 1994. Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells. *Endocrinology* 134, 432-440.

Kishi T., Aschkenasi C.J., Lee C.E., Mountjoy K.G., Saper C.B., Elmquist J.K., 2003. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 457, 213-235.

Kissileff H.R., Pi-Sunyer F.X., Thornton J., Smith G.P., 1981. C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 34, 154-160.

Koizumi A., Tsukada M., Masuda H., Kamiyama S., and Walford R.L., 1992. Specific inhibition of pituitary prolactin production by energy restriction in C3H/SHN female mice. *Mech. Ageing Dev.* 64, 21-35.

Lambert P.D., Phillips P.J., Wilding J.P., Bloom S.R., Herbert J., 1995. c-fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus following intracerebroventricular infusions of neuropeptide Y. *Brain Res.* 670, 59-65.

Lawrence C.B., Snape A.C., Baudoin F.M., Luckman S.M., 2002. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143, 155-162.

Lechan R.M., Jackson M.D., 1982. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111, 55-65.

Lechan R.M., Wu P., Jackson I.M.D., Wolfe H., Cooperman S., Mandel G., Goodman R.H. 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*; 231, 159-161.

Lechan R.M., Fekete C., 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* 153, 209-235.

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

Legradi G., Emerson C.H., Ahima R.S., Flier J.S., Lechan R.M., 1997. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing-hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138, 2569-2576.

Légrádi G., Lechan R.M., 1999. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 140, 3643-3652.

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

Leibowitz S.F., 1978. Adrenergic stimulation of the paraventricular nucleus and its effects on ingestive behavior as a function of drug dose and time of injection in the light-dark cycle. *Brain Res. Bull.* 3, 357-363.

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

Lesem M.D., Kaye W.H., Bissette G., Jimerson D.C., Nemeroff C.B., 1994. Cerebrospinal fluid TRH immunoreactivity in anorexia nervosa. *Biol. Psychiatry* 35, 48-53.

Liddle R.A., Goldfine I.D., Rosen M.S., Taplitz R.A., Williams J.A., 1985. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J. Clin. Invest.* 75, 1144-1152.

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

Lindblom J., Haitina T., Fredriksson R., Schiöth H.B., 200. Differential regulation of nuclear receptors, neuropeptides and peptide hormones in the hypothalamus and pituitary of food restricted rats. *Mol. Brain Res.* 133, 37-46.

Lisboa P.C., Oliveira K.J., Cabanelas A., Ortiga-Carvalho T.M., Pazos-Moura C.C., 2003. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E1172-1176.

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

Makino S., Hashimoto K., Gold P.W., 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 147-158.

Mancera K.F., 2007. Efecto de la inyección de antagonista de CRH-R2 en el núcleo paraventricular del hipotálamo sobre la expresión de proTRH en ratas con estrés por deshidratación. UNAM, Facultad de Ciencias.

Marks J.L., Porte D. Jr., Stahl W.L., Baskin D.G., 1990. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 127, 3234-3236.

Marsh D.J., Weingarth D.T., Novi D.E., Chen H.Y., Trumbauer M.E., Chen A.S., Guan X.M., Jiang M.M., Feng Y., Camacho R.E., Shen Z., Frazier E.G., Yu H., Metzger J.M., Kuca S.J., Shearman L.P., Gopal-Truter S., MacNeil D.J., Strack A.M., MacIntyre D.E., Van der Ploeg L.H., Qian S., 2002. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99, 3240-3245.

McMinn J.E., Wilkinson C.W., Havel P.J., Woods S.C., Schwartz M.W., 2000. Effect of intracerebroventricular alpha-MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R695-703.

Menard J., Treit, D., 1999. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 591-613.

Méndez M., Joseph-Bravo P., Cisneros M., Vargas M.A., Charli J.L., 1987. Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8, 291-298.

Menzaghi F., Heinrichs S.C., Pich E.M., Tilders F.J., Koob G.F., 1993. Functional impairment of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons with immunotargeted toxins enhances food intake induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* 618, 76-82.

Michel C., Duclos M., Cabanac M., Richard D., 2005. Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Horm. Behav.* 48, 172-179.

Mihály E., Fekete C., Legradi G., Lechan R.M., 2001. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 891, 20-31.

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

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

Moran T.H., Schwartz G.J., 1994. Neurobiology of cholecystokinin. *Crit. Rev. Neurobiol.* 9, 1-28.

Moriguchi T., Sakurai T., Nambu T., Yanagisawa M., Goto K., 1999. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci. Lett.* 264, 101-104.

Mountjoy K.G., Mortrud M.T., Low M.J., Simerly R.B., Cone R.D., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298-1308.

Muñoz M.T., Argente J., 2002. Anorexia nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 275-286.

Nakai Y., Koh T., 2001. Perception of hunger to insulin-induced hypoglycemia in anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 29, 354-357.

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

Neuner C.M., Watts A.G., 2006. Effects of GABA in the nucleus accumbens shell of ingestive behavior after dehydration-anorexia. *Appetite* 46, 372.

Nilni E.A., Friedman T.C., Todd R.B., Birch N.P., Loh Y.P., Jackson I.M.D., 1995. Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *J. Neurochem.* 65, 2462-2472.

Nilni E.A., Leiter E.H., Wetsel W.C., 1997. 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, M203.

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

Nilni E.A., Vaslet C., Harris M., Hollenberg A., Bjorbak C., Flier J.S., 2000. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 36124-3633.

O'Dowd B.F., Lee D.K., Nguyen T., Gheng R., Liu Y., Wang B., Gershengorn M.C., George S.R., 2000. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol. Endocrinol.* 14, 183-193.

Olney J.W., 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.

Pacak K., Palkovits M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502-548.

Paxinos G. and Watson, C., 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 5th Edition, Elsevier, USA.

Peyron C., Tighe D.K., van den Pol A.N., de Lecea L., Heller H.C., Sutcliffe J.G., Kilduff T.S., 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci.* 18, 9996-10015.

Ponce G., Charli J.L., Pasten J.A., Aceves C., Joseph-Bravo P., 1988. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48, 211-213.

Qu D., Ludwig D.S., Gammeltoft S., Piper M., Pelleymounter M.A., Cullen M.J., Mathes W.F., Przypek R., Kanarek R., Maratos-Flier E., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243-247.

Reed H.L., Quesada M., Hesslink R.L. Jr., D'Alessandro M.M., Hays M.T., Christopherson R.J., Turner B.V., Young B.A., 1994. Changes in serum triiodothyronine kinetics and hepatic type I 5'-deiodinase activity of cold-exposed swine. *Am. J. Physiol.* 266, E786-795.

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

Rondeel J.M., Heide R., de Greef W.J., van Toor H., van Haasteren G.A., Klootwijk W., Visser T.J., 1992. Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 56, 348-353.

Sakurai T., Amemiya A., Ishii M., Matsuzaki I., Chemelli R.M., Tanaka H., Williams S.C., Richardson J.A., Kozlowski G.P., Wilson S., Arch J.R., Buckingham R.E., Haynes A.C., Carr S.A., Annan R.S., McNulty D.E., Liu W.S., Terrett J.A., Elshourbagy N.A., Bergsma D.J., Yanagisawa M., 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.

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

Salter D., Watts A.G., 2003. Differential suppression of hyperglycemic, feeding, and neuroendocrine responses in anorexia. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 284, R174-182.

Sánchez E., Uribe R.M., Corkidi G., Zoeller R.T., Cisneros M., Zacarias M., Morales-Chapa C., Charli J.L., Joseph-Bravo P., 2001. Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 74, 407-422.

Sánchez E., Fekete C., Lechan R.M., Joseph-Bravo P., 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expression is differentially regulated in the hypothalamic paraventricular nucleus of lactating rats exposed to suckling or cold stimulation. *Brain Res.* 1132, 120-128.

Sanders N.M., Ritter S., 2000. Repeated 2-deoxy-D-glucose-induced glucoprivation attenuates Fos expression and glucoregulatory responses during subsequent glucoprivation. *Diabetes* 49, 1865-1874.

Sanders N.M., Ritter S., 2001. Acute 2DG-induced glucoprivation or dexamethasone abolishes 2DG-induced glucoregulatory responses to subsequent glucoprivation. *Diabetes* 50, 2831-2836.

Sarkar S., Lechan R.M., 2003. Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 144, 281-291.

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

Schomburg L., Bauer K., 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136, 3480-3485.

Schwartz M.W., Seeley R.J., Campfield L.A., Burn P., Baskin D.G., 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98, 1101-1106.

Schwartz M.W., Seeley R.J., Woods S.C., Weigle D.S., Campfield L.A., Burn P., Baskin D.G., 1997. Leptin increases hypothalamic pro opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 2119-2123.

Schwartz M.W., Woods S.C., Porte D. Jr., Seeley R.J., Baskin D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.

Sevarino K.A., Goodman R.H., Spiess J., Jackson M.D., Wu P., 1989. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor processing. Characterization of mature TRH and non-TRH peptides synthesized by transfected mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 264, 21529-21535.

Schaner P., Todd R.B., Seidah N.G., Nillni E.A., 1997. Processing of prothyrotropin releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J. Biol. Chem.* 272, 19958-19968.

Shi Z.X., Levy A., Lightman S.L., 1993. The effect of dietary protein on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin gene expression. *Brain Res.* 606, 1-4.

Shimada M., Tritos N.A., Lowell B.B., Flier J.S., Maratos-Flier E., 1998. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396, 670-674.

Shirasaka T., Miyahara S., Kunitake T., Jin Q.H., Kato K., Takasaki M., Kannan H., 2001. Orexin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R1114-1118.

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

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

Siegfried Z., Berry E.M., Hao S., Avraham Y., 2003. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiol. Behav.* 79, 39-45.

Silva J.E., Larsen P.R., 1983. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305, 712-713.

Silva, J.E., 2006. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 86, 435-464.

Stanley B.G., Leibowitz S.F., 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 82, 3940-3943.

Stanley B.G., Magdalin W., Seirafi A., Thomas W.J., Leibowitz S.F., 1993. The perifornical area: the major focus of (a) patchily distributed hypothalamic neuropeptide Y-sensitive feeding system(s). *Brain Res.* 604, 304-317.

Steward C.A. Horan T.L., Schuhler S., Bennett G.W., Ebling F.J., 2003. Central administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster. *Neuroreport* 14, 687-691.

Stoving R.K., Hangaard J., Hagen C., 2001. Update on endocrine disturbances in anorexia nervosa. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 14, 459-480.

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

Sun Y., Lu X., Gershengorn M.C., 2003. Thyrotropin-releasing hormone receptors: similarities and differences. *J. Mol. Endocrinol.* 30, 87-97.

Suzuki T., Kohno H., Sakurada T., Tadano T., Kisara K., 1982. Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17:249-253.

Suzuki S., Solberg L.C., Redei E.E., Handa R.J., 2001. Prepro-thyrotropin releasing hormone 178-199 immunoreactivity is altered in the hypothalamus of the Wistar-Kyoto strain of rat. *Brain Res.* 913, 224-233.

Swanson L.W., Sawchenko P.E., 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* 6, 269-324.

Tamai H., Mori K., Matsubayashi S., Kiyohara K., Nakagawa T., Okimura M.C., Walter R.M. Jr, Kumagai L.F., Nagataki S., 1986. Hypothalamic-pituitary-thyroidal dysfunctions in anorexia nervosa. *Psychother. Psychosom.* 46, 127-13.

Tang R., Man W.S.Y., 1991. The regional distribution of TRH, leu-enkephalin, met-enkephalin, substance P, somatostatin and cholecystokinin in the rat brain and pituitary. *Neuropeptides* 19, 287-292.

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

Thornton J.E., Cheung C.C., Clifton D.K., Steiner R.A., 1997. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 138, 5063-5066.

Treit D., Pinel J.P., Fibiger H.C., 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Beba.* 15, 619-626.

Troisi A., Di Lorenzo G., Lega I., Tesauro M., Bertoli A., Leo R., Iantorno M., Pecchioli C., Rizza S., Turriziani M., Lauro R., Siracusano A., 2005. Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 81, 259-266.

Tschöp M., Smiley D.L., Heiman M.L., 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.

Tschöp M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R., Folwaczny C., 2001. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 24, RC19-21.

Tso J.H., Sun X.H., Kao T.H., Reece K.S., Wu R., 1985. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res.* 13, 2485-2502.

Uribe R.M., Redondo J.L., Charli J.L., Joseph-Bravo P., 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58, 140-145.

Vallès A., Martí O., García A., Armario A., 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R1138-1144.

Van Dijk G., Thiele T.E., Donahey J.C., Campfield L.A., Smith F.J., Burn P., Bernstein I.L., Woods S.C., Seeley R.J., 1996. Central infusions of leptin and GLP-1-(7-36) amide differentially stimulate c-FLI in the rat brain. *Am. J. Physiol.* 271, R1096-1100.

van Haasteren G.A., Linkels E., Klootwijk W., van Toor H., Rondeel J.M., Themmen A.P., de Jong F.H., Valentijn K., Vaudry H., Bauer K., Visser T.J., de Greef J., 1995. 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. *J. Endocrinol.* 145, 143-153.

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

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

Vargas M.A., Joseph-Bravo P., Charli J.L., 1994. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology* 60, 323-330.

Vargas M.A., Uribe R.M., Cisneros M., Romero F., Gonzalez S., Joseph-Bravo P., Charli J.L., 2002. Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohipophysis. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 363-369.

Vijayan E. McCann S.M., 1977. Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 100, 1727-1730.

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

Watts A.G., Sanchez-Watts G., Kelly A.B., 1999. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J. Neurosci.* 19, 6111-6121.

Watts A.G., Salter D.S., Neuner C.M., 2007. Neural network interactions and ingestive behavior control during anorexia. *Physiol. Behav.* 91, 389-396.

White N., Jeffcoate S.L., Griffiths E.C., Hooper K.C., 1976. Effect of thyroid status on the thyrotrophin releasing hormone-degrading activity of rat serum. *J. Endocrinol.* 71, 13-19.

Wirth M.M., Olszewski P.K., Yu C., Levine A.S., Giraudo S.Q., 2001. Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides* 22, 129-134.

Woods S.C., Seeley R.J., Porte D. Jr., Schwartz M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280, 1378-1383.

Woodward C.J., Hervey G.R., Oakey R.E., Whitaker E.M., 1991. The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats. *Br. J. Nutr.* 66, 117-127.

Wynne K., Stanley S., McGowan B., Bloom S., 2005. Appetite control. *J. Endocrinol.* 184, 291-318.

Yamada M., Radovck S., Wondisford R.E., Nakayama Y., Weintraub B.D., Wilber J.F., 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human preprothyrotrophin-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* 4, 551-556.

Yamada M., Monden T., Satoh T., Iizuka M., Murakami M., Iriuchijima T., Mori M., 1992. Differential regulation of thyrotrophin-releasing hormone receptor mRNA levels by thyroid hormone in vivo and in vitro (GH3 cells). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 367-372.

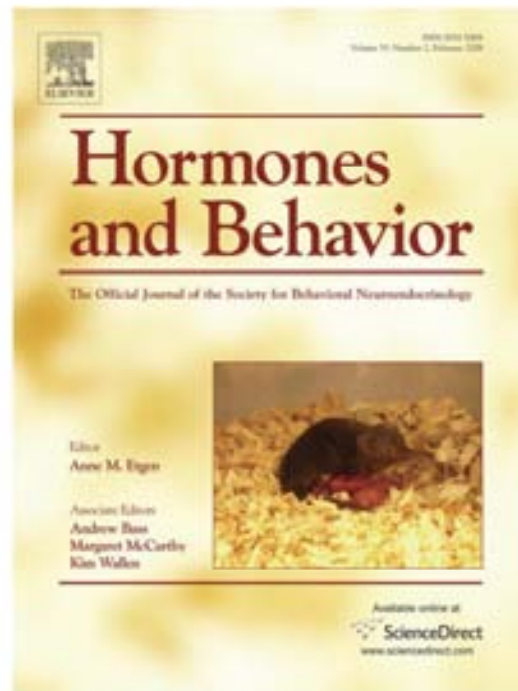
Yen P., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev* 81, 1097-1142.

Yu R., Hinkle P.M., 1998. Signal transduction, desensitization, and recovery of responses to thyrotrophin-releasing hormone after inhibition of receptor internalization. *Mol. Endocrinol.* 12, 737-749.

Zoeller R.T., Kabeer N., Albers H.E., 1990. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotrophin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* 127, 2955-2962.

X.ANEXO

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article was published in an Elsevier journal. The attached copy is furnished to the author for non-commercial research and education use, including for instruction at the author's institution, sharing with colleagues and providing to institution administration.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure

Lorraine Jaimes-Hoy^{a,b}, Patricia Joseph-Bravo^c, Patricia de Gortari^{a,b,*}

^a *División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría RFM, México D.F., México*

^b *Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE, México D.F., México*

^c *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México*

Received 5 October 2007; revised 5 November 2007; accepted 6 November 2007

Available online 19 November 2007

Abstract

TRH neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), regulate pituitary thyroid axis (HPT). Fasting activates expression of orexigenic peptides from the arcuate nucleus, increases corticosterone while reduces leptin, and pro-TRH mRNA levels despite low serum thyroid hormone concentration (tertiary hypothyroidism). TRH synthesis is positively regulated by anorexigenic peptides whose expression is reduced in fasting. The model of dehydration-induced anorexia (DIA) leads to decreased voluntary food intake but peptide expression in the arcuate is similar to forced-food restriction (FFR), where animals remain hungrier. We compared the response of HPT axis of female Wistar rats submitted to DIA (2.5% saline solution, food *ad libitum*, 7 days) with FFR (provided with the amount of food ingested by DIA) and naive (N) group fed *ad libitum*, as well as their response to acute cold exposure. Pro-TRH and pro-CRH mRNA levels in the PVN were measured by RT-PCR, TRH content, serum concentration of TSH and thyroid hormones by radioimmunoassay. DIA rats reduced 80% their food consumption compared to N, decreased PVN pro-CRH expression, serum estradiol and leptin levels, increased corticosterone similar to FFR. HPT axis of DIA animals failed to adapt; FFR presented tertiary hypothyroidism and DIA, primary. Response to cold stimulation leading to increased pro-TRH mRNA levels and TRH release was preserved under reduced energy availability in FFR rats but not in DIA, although the dynamics of hormonal release differed: TSH release augmented only in naive; thyroxine in all but highest in DIA, and triiodothyronine in FFR and DIA suggesting a differential regulation of deiodinases. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: TRH; Hypothalamic–pituitary–thyroid axis; Leptin; Thyroid hormones

Introduction

Neurons of the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus synthesize thyrotropin-releasing hormone (TRH) and corticotropin-releasing hormone (CRH), peptides that play crucial roles in energy homeostasis (Lechan and Fekete, 2006) or during chronic stress (Chrousos, 2000; Michel et al., 2005). Conditions of homeostatic challenge such as low nutrient availability and fasting depress the activity of the hypothalamic–

pituitary–thyroid (HPT) axis in male and female rats: tertiary hypothyroidism develops, characterized by decreased pro-TRH mRNA expression in the PVN and low thyrotropin (TSH), thyroxine (T₄) and triiodothyronine (T₃) levels (Blake et al., 1991; Shi et al., 1993; van Haasteren et al., 1995, 1996; de Gortari et al., 2000). The normal feedback regulation of thyroid hormones (TH) is impaired since, despite the low TH circulating levels, the biosynthesis of TRH in the hypophysiotropic neurons of the PVN remains inhibited (Blake et al., 1991). Negative energy balance conditions induce the expression of neuropeptides known to participate in the control of food intake: i.e. orexigenic peptide mRNA levels increase (in the arcuate nucleus [ARH]: neuropeptide Y [NPY], agouti related peptide [AgRP]; in lateral hypothalamus [LH]: orexins, melanin-concentrating hormone [MCH]) while anorexigenic's decrease (α -melanocyte-

* Corresponding author. División de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, C.P. 14370, México D.F., México. Fax: +52 55 56 55 99 80.

E-mail address: pgortari@imp.ilo.mx (P. de Gortari).

stimulating hormone [α -MSH], cocaine and amphetamine regulated-transcript [CART] in ARH) (Leibowitz and Wortley, 2004). TRHergic neurons have receptors for orexigenic and anorexigenic peptide signals arising from the LH, such as (CRH), and from the ARH (NPY, CART, AgRP and α -MSH) (Mountjoy et al., 1994; Chalmers et al., 1995; Broberger, 1999; Fekete et al., 2002, 2004). Pro-TRH expression is restored by injecting either leptin, α -MSH or CART to fasted animals (Lechan and Fekete, 2006). Circulating levels of leptin, an anorexigenic protein released from adipose tissue, with re-activating functions on energy expenditure (Ahima and Osei, 2004), are also reduced during fasting; leptin induces pro-TRH expression directly (Nillni et al., 2000; Harris et al., 2001) or indirectly through its inhibitory effects on NPY and stimulatory on pro-opiomelanocortin [POMC] neurons of the ARH (Schwartz et al., 1996).

The synchrony between the fuel reservoir status and food intake that compensates the excess or deficit of energy in animals, can be disrupted by different psychological or physiological stimuli and may favor the appearance of an aberrant feeding behavior known as anorexia. Anorexia is defined as a loss of appetite despite low body weight and limited lipid deposits. It may result during illness, induced by different psychological factors, or as a response to homeostatic challenges like cellular dehydration; it is always accompanied by stress axis activation (Siegfried et al., 2003; Connan et al., 2003). In contrast to food restriction, anorexic patients present normal (or subnormal) serum levels of thyroxine (T_4) and thyrotropin (TSH), as well as thyroid atrophy (Stoving et al., 2001); TRH-induced TSH release is blunted or retarded (Tamai et al., 1986; Lesem et al., 1994; Muñoz and Argente, 2002; Troisi et al., 2005; Brambilla et al., 2006). The alterations of the HPT axis in anorexia nervosa are believed to be of a central origin due to reduced hypothalamic TRH secretion and are known as "low T_3 syndrome".

Dehydration is a model of anorexia, induced in animals by the consumption of a hyperosmolar solution of NaCl (2.5%) (Watts et al., 1999). It provokes voluntarily reduced food intake with the associated changes of negative energy balance that are similar to those seen in pair-fed food-restricted animals: weight loss, increased corticosterone, lowered leptin and insulin serum levels, reduced expression of POMC and increased NPY expression in the arcuate nucleus (Beady et al., 1990; Watts et al., 1999). All these signals should stimulate eating, however feeding is increasingly suppressed suggesting the actions of inhibitory control networks (Watts, 2001; Watts et al., 2007). The anorexic behavior appears as an adaptation to the altered hydric balance, diminishing the need for water in digestion and contributing to a more adequate distribution in the organism; decreased feeding impedes the increase in the cellular osmolality of the organism (Watts et al., 2007). The diminished food intake in dehydration-induced anorexic (DIA) animals is accompanied by a similar pattern of neuropeptide expression in the arcuate nucleus as their pair-fed controls; however, activation of CRH neurons in the lateral hypothalamus (LH) that project to the PVN is observed only in DIA (Watts et al., 1999).

TRHergic cells contain CRH receptors (Hisano et al., 1993) and their activity can be modified by different kinds of stress

(Cizza et al., 1995; Gutiérrez-Mariscal et al., submitted for publication), we therefore analyzed if pro-TRH expression of PVN neurons and parameters of the HPT axis function, could be differentially modified in dehydration-induced anorexia compared to paired-forced food restricted (hungered) animals, in particular, due to the anorexic effects of TRH. Central or peripheral TRH administration reduces food and water intake in rats and hamsters (Vijayan and McCann, 1977; Karydis and Tolis, 1998; Choi et al., 2002; Steward et al., 2003) and when injected directly into the medial hypothalamus the highest inhibitory effect is observed on feeding and drinking while into the lateral hypothalamus, only diminishes water intake (Suzuki et al., 1982).

Neuronal stimuli such as cold exposure increases in a fast and transient manner pro-TRH expression in the PVN (Uribe et al., 1993; Sánchez et al., 2001); therefore, we also studied whether forced-food restriction (FFR) or DIA affect this response. Given that the stress history of the animal can affect neuroendocrine responses, we evaluated the degree of anxiety-like behavior imposed by DIA or FFR.

Female Wistar rats were submitted up to 7 days of DIA and results compared to a pair-fed group (FFR) and naïve. Animals were exposed on day 7 for 1 h to 4 °C. Anxiety-like behavior was evaluated on day 3 in the defensive-burying test (DBT) (Treit et al., 1981). The activity of the HPT axis was evaluated measuring: the relative mRNA levels of TRH-R1 in the PVN and in adenohypophysis, the degrading enzyme of TRH: pyroglutamyl-aminopeptidase II (PPII) only in the later, TRH content in dorsal and mediobasal hypothalamus and, serum levels of TSH, T_3 , and T_4 in serum. The stress response was analyzed measuring serum corticosterone concentration and the relative mRNA levels of pro-CRH in the PVN. Serum leptin, prolactin and estradiol levels were also quantified.

Materials and methods

Animals and housing

All diets and treatments were approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Psiquiatría (INPRFM) following the guidelines of the Neuroscience Society (USA). Wistar female rats (225–230 g body weight (s.w.)) from the Institute's (INPRFM) animal house were maintained with a 12 h light-dark cycle (7:00–19:00 h), 23 °C of temperature and water and food consumption *ad libitum*. Experiments of cold exposure were performed at the Instituto de Biotecnología, UNAM with Wistar female rats raised and kept in its animal house.

Experiments

Seven days before the experiment, animals were placed in individual cages and randomly selected to form 3 groups from the same lot. On the first day, the naïve group (N) received water and food *ad libitum*; the dehydrated group (DIA) received a 2.5% NaCl (SIGMA, St. Louis, MO, USA) solution as drinking liquid (Watts et al., 1999). Solid food (Lab rodent diet #5001, PMI feeds; Brentwood, MO, USA) and liquid ingestion were measured daily at 18:00 h in all groups. Food was administered at the end of the light cycle (18:30 PM); forced-food restricted animals (FFR) received the amount of solid food ingested by the DIA group on the previous day and tap water *ad libitum*. Six independent experiments were performed including 4–8 rats/group/experiment. By the 1st trial, FFR received the calculated food consumed by DIA on the first day of the first 2 experiments. Total energy provided by the solid food ingested was calculated taking into account the amount of metabolizable energy in PMI food is 3.04 Kcal/g. Body weight was registered daily.

Cold exposure

Animals submitted to dehydration for 7 days as explained above, as well as food-restricted and naive groups ($n = 5$), were introduced for 1 h to a 4 °C chamber located in front of the experimental room.

Rats were decapitated (11:00–12:00 AM), trunk blood was collected to measure serum hormone and protein levels; brain and adenohypophysis (AH) were excised and kept frozen at -70 °C. From frozen brains, a coronal thick slice (approximately -0.6 to -3.6 mm from bregma (Paxinos and Watson, 2005)) was hand-dissected cutting transversally to obtain dorsal (DHPT) and medial basal (MBH) hypothalamus for TRH content quantification. The dorsal hypothalamus contained, besides the paraventricular nucleus, part of the periventricular nucleus, medial preoptic area, postmedial and medial division of the bed nucleus of the stria terminalis and of the posterior hypothalamic area (DHPT: H: 7.2 to 8.2 mm; L: -1.0 to 1.0 mm); the medial basal hypothalamus (MBH: H: 8.2 to 9.8 mm; L: -1.0 to 1.0 mm) contained the median eminence, the arcuate nucleus, and part of the anterior hypothalamic area (AHA). From different experiments, the PVN was punch-dissected with a 1.0 mm diameter sample corer, from a similar coronal thick slice (H: 7.2 to 8.2 mm; L: -0.5 to 0.5 mm) to measure mRNA levels of pro-TRH, TRH-R1, and pro-CRH. In this punch-dissected region all the PVN is included, but also a small part of the medial preoptic area (-0.92 to -1.38 from bregma that constitutes the 15% of the dissected region) that also expresses pro-TRH. However, given the small contribution of this area, we refer the data as PVN.

Each AH was used to measure TRH-R1, and PPII mRNA levels. Adipose tissues were removed and weighed: white adipose tissue (WAT) was excised from the surroundings of the ovaries and brown adipose tissue (BAT) was obtained from the interscapular region.

mRNA semi-quantification

From PVN or AH were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (ICN, Acron, Ohio, USA) and total RNA extracted as described (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA quality of all samples was verified by electrophoresis quantifying 28S/18S ratio and discarded if lower than 1.8 or, when evidence of degradation was observed by increased staining at the end of the gel, the ratio of O.D. absorbencies 260/280 nm and 260/230 nm was also evaluated considering appropriate when > 1.8 (Aguilar-Vallés et al., 2005; de Gortari et al., 2006). mRNA levels of pro-TRH, pro-CRH, TRH-R1 and PPII were semi-quantified by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), cyclophilin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) were used as control transcripts, essentially as reported (Aguilar-Vallés et al., 2005). cDNA was prepared from 1.5 µg of RNA (M-MLV reverse transcriptase [Carlsbad, CA, USA], oligo-dT and specific oligonucleotides, whose sequence was verified to prevent the formation of dimer structures, as reported (Aguilar-Vallés et al., 2005; de Gortari et al., 2006) and synthesized at the UNAM Biotechnology Institute's facilities. The number of cycles for each probe was optimized for PVN and for AH, using 25 pmol probes of pro-TRH (sense: 5'-GGCCTTGGTTCGCTCGACTCGGCTTG-3', antisense: 5'-ATGACTCTGCTCAGGTCATCTAGAAGCT-3'), TRH-R1 (sense: 5'-ACCCAGAGAAGCAGCCAGCGTACA-3', antisense: 5'-GATCCGCCACAGCAGACTCACCAG-3'), PPII (sense: 5'-GGACACCCAAATAATTCCT-3', antisense: 5'-CTGGATCCATACAAAAG-3'), pro-CRH (sense: 5'-AGAA-GAGAAGCCCCCTAAAC-3', antisense: 5'-ATCAGAATCGCTGAGGTTG-3') and, as "marker genes" 50 pmol of cyclophilin (sense: 5'-GGGGAGAAAAG-GATTGGCTA-3', antisense: 5'-ACATGCTTGCATCCAGCC-3') or G3PDH (sense: 5'-CATGTAGCCATGAAGTCCACCAC-3', antisense: 5'-TGAAGG-TGGTGTCAACCGATTGGC-3') and 0.5 µl Taq DNA polymerase (5U) (Biotechnology Unit, UNAM, México, DF). Final conditions for PVN were: 26 cycles for pro-TRH, 29 for TRH-R1, 26 for pro-CRH, and 21 for cyclophilin or G3PDH. For AH: 26 cycles for TRH-R1, 30 for PPII, and 20 for cyclophilin or G3PDH. Each cycle consisted of: 1 min at 94 °C, followed by 1 min at 64 °C for pro-TRH, TRH-R1, cyclophilin and G3PDH, 55 °C for PPII, 60 °C for pro-CRH, and a final min at 72 °C. All cDNAs had a final extension of 10 min at 72 °C. Several cDNAs were semi-quantified from the same RT reaction.

PCR products (10 µl of each DNA, and 5 µl of either G3PDH or cyclophilin) were separated by 2% of agarose (or 2.5% for CRH) (Ultra-pure Bio-Rad, Hercules CA, USA) gel electrophoresis, stained with ethidium bromide (1 mg/L) and density measured with a Fluor-S MultiImager (BioRad, Hercules CA, USA). The relative amounts of the cDNAs under study were calculated as the ratio of each

cDNA over cyclophilin or G3PDH cDNA. Care was taken to include in the same gel, samples of N, FFR and DIA. The ratio of G3PDH/cyclophilin was evaluated to verify possible variations between groups in the expression of these markers.

TRH quantification

Dorsal (DHPT) or medio-basal (MBH) hypothalamus were sonicated in 500 µl of 20% acetic acid and centrifuged for 15 min at 4 °C and 12,000×g. After adding cold methanol to the supernatant (65% final concentration), it was left overnight at -20 °C, further centrifuged for 15 min at 4 °C, 12,000×g, and evaporated. Sediments were diluted in 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 containing 0.25% bovine serum albumin (radioimmunoassay [RIA] grade, Sigma, St. Louis, MO, USA) to quantify TRH by RIA, as described (de Gortari et al., 1995). An internal standard of hypothalamic extract was included in every assay and parallelism with the curve, verified. Limit of detection: 15 pg, 4% inter-assay and 8% intra-assay variation.

Hormone serum levels measurements

NIDDK (National Hormone and Pituitary Program) protocol and materials were used for rat serum TSH and prolactin quantification; for TSH, 50 µl of serum were diluted 1:3 with RIA buffer and used for analysis (limit of detection: 5 pg, 13% inter-assay, 6% intra-assay variability); 50 µl of undiluted serum were used for prolactin (limit of detection: 15 pg, 5% inter-assay and intra-assay variability). Corticosterone was quantified using ICN Biomedicals (Acron, Ohio, USA) kit, with antiserum diluted 1:1000 (limit of detection: 5 pg, 8% inter-assay, 7% intra-assay variability). 100 and 25 µl of serum were used to measure T_3 and T_4 , respectively, with the RIA kit from Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA) (limit of detection: T_3 (7 ng/dL), T_4 (0.25 µg/dL), inter-assay variability (T_3 , T_4 10%), intra-assay variability (T_3 : 6%, T_4 : 7%). Serial dilutions of normal serum were used as internal standard in all assays. Leptin was measured colorimetrically with the enzyme immunoassay kit for rat leptin Thermo from Assay Design (Ann Arbor, MI, USA) using 100 µl of serum diluted 1:2 with assay buffer (limit of detection: 46.7 pg/ml; 3.3% inter-assay, 4.1% intra-assay variability). Estradiol was analyzed in 200 µl of serum with a commercial rat kit Ultra-sensitive estradiol RIA DSL-0100 (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas, USA); (limit of detection: 2.2 pg/ml; 14% inter-assay, 4% intra-assay variability).

Protein determination

30 µl of serum diluted 1:3 were digested with 1 N NaOH (Baker, México) for 24 h at room temperature and protein concentration quantified by the folin-phenol reagent method (Lowry et al., 1951).

Anxiety-like behavior test

Since it has been reported that animals consuming a 2.5% saline solution develop anorexia in the second day of dehydration (Watts et al., 1999), we tested for anxiety-like behaviors. On the third day of dehydration and food-restricted restriction, animals were submitted to a defensive-burying test (DBT).

DBT is an experimental model to study anxiety-like behavior (Treit et al., 1981; De Boer and Koolhaas, 2003). The test chamber consists in a Plexiglas cage (46×44×30 cm) filled with 5-cm-deep bedding material, that has a removable probe inserted through a hole made in one side of the box, 2 cm above bedding, the probe (Teflon bar of 7 cm surrounded by copper wire connected to a shock-generator scrambler (La Fayette Instruments Co., model 5806)) provides a 0.3 mA shock when touched by the exploring animal.

Once the animal receives its first shock, it starts to bury the probe, because it recognizes it as an aversive stimulus; the animal pushes a pile of bedding material with rapid alternating movements of its forepaws. Burying behavior is an active avoidance, and during the performance of the test, the most important behavioral parameter is the cumulative time spent by the animal burying the electrode; an increase of time in burying signifies anxious-like conduct (Treit et al., 1981; Menard and Treit, 1999; De Boer and Koolhaas, 2003).

DBT was performed between 1000 and 1200 h. Animals were placed in the test chamber for 10 min and the performance videotaped for posterior analysis. The behavioral parameters studied were: latency to bury (considered to reflect

reactivity), cumulative time the animals spent burying the probe and total number of shocks (De Boer and Knolhaas, 2003).

Statistics

A one-way ANOVA was performed to compare data between different experimental and control groups and a two-way ANOVA, to evaluate results for kinetics and the cold-exposure experiments; when significant ($p < 0.05$), analysis was followed by Fisher's post-hoc test (StatView 4.51, Abacus Concepts Inc.).

Results

Time course of the response to 7 days treatment

Forced-food restricted (FFR) rats were provided the same amount of food consumed by DIA animals (Fig. 1A) and usually

finished it by the following morning. Fig. 1 shows the average of the results of six experiments: DIA animals decreased their food intake since the first day ($65 \pm 3\%$ vs. N: $100 \pm 5\%$) and even more (to 25%), by the 7th (N: 100 ± 2 , FFR: 24 ± 2 , DIA: $24 \pm 4\%$; $F_{(2,21)} = 286.21$, $p < 0.0001$). As the FFR group received the exact amount of food ingested by DIA animals, the curve describing food intake of both groups is superimposable. By the 7th day, energy intake of the DIA and FFR groups diminished by 82% and by 84% respectively (N: 104.45 ± 3 , FFR: 17 ± 1.4 , DIA: 17.7 ± 1.6 Kcal/kg b.w.; $F_{(2,112)} = 546.92$, $p < 0.0001$). Liquid intake decreased in FFR while increased in DIA animals since the first day compared to naïve (N: 100 ± 3 , FFR: 62 ± 5 , DIA: $157 \pm 9\%$; $F_{(2,81)} = 67.2$, $p < 0.0001$) (Fig. 1B). Body weight of DIA animals was lower ($93 \pm 1\%$ vs. $100 \pm 2\%$) than naïve since day 1; by the 7th, it was decreased to $74 \pm 2\%$ of naïve

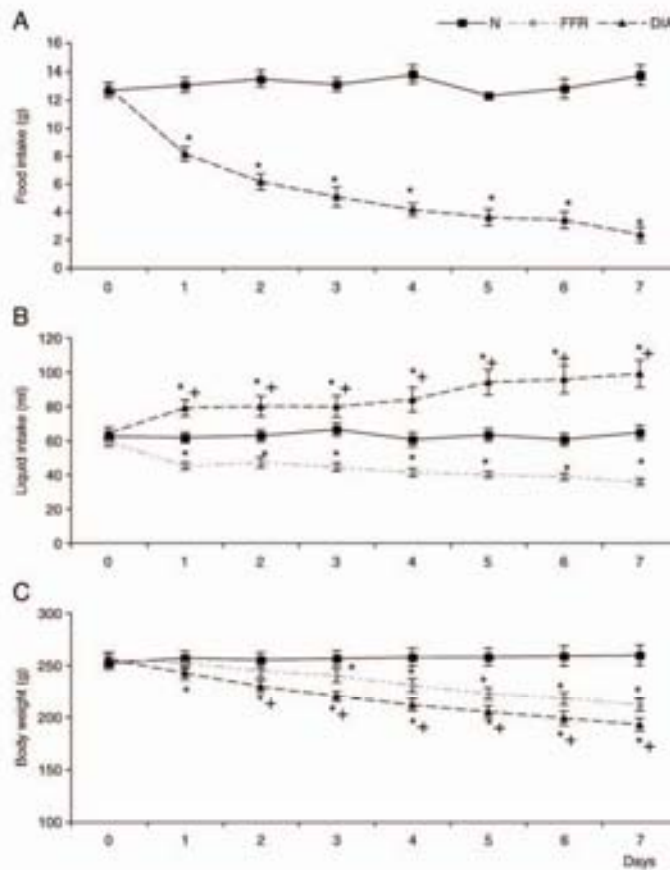


Fig. 1. Daily food, liquid intake and body weight measurements. (A) Food consumed by: Naïve (N) and DIA (detylated-induced anorectic) animals that received food *ad libitum*; FFR (forced-food restricted) animals were pair-fed with DIA intake. (B) Liquid intake: Naïve and FFR animals consumed tap water during 7 days; DIA groups received a 2.5% NaCl solution. Registers were taken by difference between the amount offered and that left. (C) Daily body weight records. All values are the mean (g, ml) \pm SEM of the average of daily measurements of six different experiments (8 rats/group/experiment). One-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc test showed significant differences when * $p < 0.05$ vs. Naïve, + vs. FFR animals.

($F_{(2,51)}=76.02, p<0.0001$). Although FFR animals ingested the same amount of food as DIA group, they lost less body weight than DIA animals (Fig. 1C).

Response of the HPT axis

In order to identify the time course of the HPT axis response, animals were sacrificed after 1, 3, 5 or 7 days exposure to dehydration or forced-food restriction. The expression of control transcripts G3PDH or cyclophilin was similar among groups; by day 7, the ratio of G3PDH/cyclophilin cDNA signal was N: 1.29 ± 0.01 , FFR: 1.31 ± 0.01 , DIA: 1.37 ± 0.02 arbitrary units (a representative gel is shown in Fig. 2A).

Compared to naïve, levels of pro-TRH mRNA decreased in the PVN of FFR while in DIA animals, values were slightly but significantly increased since day 5 (Fig. 2A) [two-way ANOVA showed significant differences between groups ($F_{(2,28)}=10.5, p<0.001$) but no interaction between groups and times of sacrifice ($F_{(3,28)}=2.43, p<0.05$)]. The ratio of pro-TRH cDNA signal over cyclophilin or G3PDH was similar (not shown).

TSH serum levels of FFR did not show significant changes vs. naïve; levels of DIA rats were higher than either naïve or FFR since day 5 and the same trend continued on day 7 (Fig. 2B) [two-way ANOVA showed significant differences between groups ($F_{(2,36)}=8.45, p<0.001$) and a significant interaction between groups and times of sacrifice ($F_{(6,36)}=4.04, p<0.01$)]. Levels of T_4 diminished by day 7 in FFR vs. N animals, while no

significant changes were present in DIA (Fig. 2C) [One-way ANOVA showed significant differences between FFR and N by day 7 ($F_{(2,8)}=6.5, p<0.05$); two-way ANOVA was significant between times of sacrifice ($F_{(3,34)}=6.18, p<0.001$)]. T_3 levels significantly diminished in both experimental groups, since day 3 in FFR and since day 5 in DIA animals, and the same trend was maintained by the 7th day (Fig. 2D) [two-way ANOVA showed significant differences between groups ($F_{(2,36)}=13.93, p<0.0001$), and times of sacrifice ($F_{(3,36)}=14.78, p<0.0001$)].

Corticosterone serum levels increased in FFR animals since day 5 vs. naïve (N: 350 ± 44 , FFR: 471 ± 20 ng/ml), while DIA animals showed a significant increase since the 3rd day vs. naïve (N: 365 ± 43 , DIA: 537 ± 24 ng/ml), the same trend was maintained by day 7, where levels of DIA rats were higher than either naïve or FFR (N: 332 ± 16 , FFR: 454 ± 22 , DIA: 543 ± 18 ng/ml), [two-way ANOVA only showed significant differences between groups ($F_{(2,36)}=24.18, p<0.0001$), data not shown].

HPT axis parameters of animal sacrificed on day 7

Since on day 7 the most striking and consistent differential changes appeared between DIA and FFR groups on parameters of the HPT axis, we performed the subsequent experiments sacrificing animals after 7 days of treatment to measure other variables that could reflect the status of the HPT axis function and regulation. Six independent experiments with 4–8 rats/

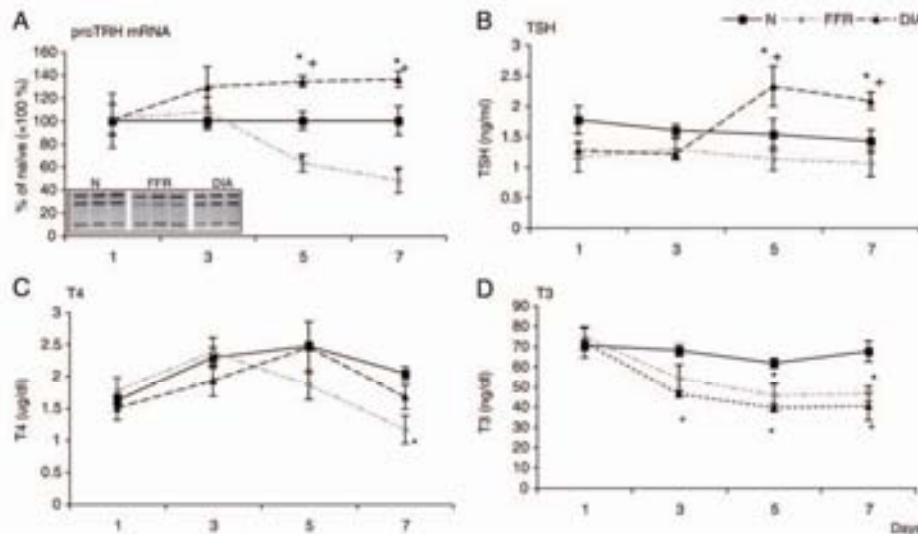


Fig. 2. Kinetics of variations in pro-TRH gene expression and hormone serum levels. Rats were sacrificed after 1, 3, 5, 7 days of dehydration-induced anorexia and values expressed as the mean \pm SEM of % of naïve animals (N = 100% [4 rats/group/experiment]). Pro-TRH mRNA levels were semi-quantified by RT-PCR and serum hormone concentration by RIA. (A) mRNA levels of pro-TRH in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). Values are the ratio of pro-TRH cDNA/cyclophilin cDNA signals. The insert depicts representative gels of cDNAs from naïve (N), dehydrated-induced anorexic (DIA) and, forced-food restricted (FFR) animals; superior band = G3PDH, middle = pro-TRH, lower = cyclophilin. (B) Serum TSH levels of N, DIA and FFR. (C) Total thyroxine (T_4) serum levels. (D) Total triiodothyronine (T_3) serum levels. Two-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc test showed significant differences when * $p<0.05$ vs. Naïve; + vs. FFR group.

group/experiment were performed. Weight of white adipose tissue (WAT) diminished similarly in both experimental groups ($F_{(2,27)}=4.012$, $p<0.05$), the decrease in brown adipose tissue (BAT) did not achieve significance. Protein concentration in serum did not vary (Table 1). Leptin and estradiol levels were diminished to a similar extent in DIA and FFR animals compared to naïve (Table 1) (leptin: $F_{(2,43)}=45.4$, $p<0.0001$; estradiol: $F_{(2,29)}=11.75$, $p=0.001$). In all experiments, corticosterone levels augmented in both FFR and DIA animals (Table 1) ($F_{(2,20)}=26.8$, $p<0.0001$) showing that a similar stressful condition is being induced in both experimental groups.

As control of the reproducibility of response to dehydration and forced-food restriction (Watts et al., 1999), pro-CRH mRNA levels were evaluated in the PVN. Care was taken when dissecting the PVN not to include the lateral hypothalamus where CRH gene expression increases in DIA animals (Watts et al., 1999). Pro-CRH expression was reduced in DIA and FFR animals (Table 1).

TRH content was quantified in the dorsal and medial–basal hypothalamus, pro-TRH and TRH-R1 mRNA levels in the PVN, and in AH the expression profile of TRH-R1 and PPH. PVN mRNA levels of pro-TRH decreased in forced-food restricted animals while increased in DIA group significantly ($F_{(2,45)}=36.76$, $p<0.0001$). In contrast, TRH-R1 expression decreased only in FFR ($F_{(2,37)}=5.62$, $p<0.01$) (Fig. 3A). TRH content increased in the MBH only in the FFR group ($F_{(2,34)}=8.02$, $p<0.01$) (Fig. 3A); values did not vary in the dorsal hypothalamus (DHT, that included medial preoptic area).

Table 1
Effect of 7 days of dehydration-induced anorexia or forced-food restriction.

	Naïve	Forced-food restricted	Dehydrated
Energy consumed (kcal/kg b.w./day)	101 ± 3	17 ± 1.4 ^a	17.7 ± 1.6 ^a
Body weight (g)	260 ± 10	212 ± 6 ^a	193 ± 6 ^{a,b}
WAT (g/kg b.w.)	22 ± 2	16 ± 2 ^a	17 ± 1 ^a
BAT (g/kg b.w.)	1.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Protein (µg/ml)	133 ± 2.5	123 ± 4.5	130 ± 4.6
Pro-CRH mRNA levels (% of naïve)	100 ± 10	81 ± 4 ^a	80 ± 4 ^a
Leptin (% of naïve)	100 ± 8 (425 ± 33 µg/ml)	33 ± 4 ^a	37 ± 5 ^a
Corticosterone (% of naïve)	100 ± 7 (151 ± 15 ng/ml)	263 ± 23 ^b	218 ± 17 ^a
Estradiol (% of naïve)	100 ± 11 (26 ± 4 µg/ml)	40 ± 9 ^a	31 ± 6 ^a
Prolactin (% of naïve)	100 ± 9 (0.97 ± 0.09 ng/ml)	20 ± 4 ^a	101 ± 9 ^a

Daily food intake of naïve (N), DIA (dehydrated-induced anorectic) and FFR (forced-food restricted) animals was recorded as described in Fig. 1. Animals were sacrificed after 7 days; values of independent experiments are calculated as % of Naïve group ($n=10$) and expressed as the mean ± SEM. Energy obtained by the amount of food consumed was calculated considering that PMI feeds provides 3.04 kcal/g; kcal consumed were normalized by kg of body weight (b.w.). WAT (white adipose tissue) and BAT (brown adipose tissue) were weighed (g) and normalized by kg of body weight. Hormone serum levels were quantified by RIA. Number of determinations: energy consumed and body weight $n=35$; leptin $n=17$; corticosterone $n=8$; rest of determinations $n=10$. One-way ANOVA followed by Fisher's post-hoc test was performed and differences were considered significant when $p<0.05$; (a) means significant differences vs. Naïve and (b) vs. FFR.

In AH, TRH-R1 mRNA levels increased only in FFR ($F_{(2,32)}=7.99$, $p<0.001$); the difference in PPH mRNA levels was not significant (Fig. 3B).

Thyrotropin and thyroid hormone serum levels presented similar variations as in the kinetic experiment: TSH levels decreased in FFR animals while increased in DIA group (Fig. 3C) ($F_{(2,114)}=32.04$, $p<0.0001$); T_4 concentration decreased similarly in DIA and FFR rats vs. naïve ($F_{(2,55)}=20.04$, $p<0.0001$). Levels of T_3 were consistently diminished in both experimental groups when compared to naïve ($F_{(2,50)}=25.14$, $p<0.0001$) (Fig. 3C). The levels of prolactin were very low in FFR compared to either N or DIA animals ($F_{(2,26)}=26.82$, $p<0.0001$) (Table 1).

Response to cold exposure

The weights of WAT and BAT did not vary after cold exposure but, as in previous experiments, were lower in FFR and DIA animals. Values for WAT were FFR: 8 ± 0.8 , DIA: 7 ± 0.7 , N: 15 ± 1.8 g/kg b.w.; two-way ANOVA showed significance between groups $F_{(2,57)}=11$, $p<0.0001$; while difference between temperature conditions or interaction was not significant. Values for BAT were FFR: 1.8 ± 0.1 , DIA: 1.8 ± 0.2 , N: 2.5 ± 0.3 g/kg b.w.; two-way ANOVA showed significance between groups $F_{(2,57)}=5.22$, $p<0.0001$, while difference between temperature conditions or interaction was not significant.

Animals kept at room temperature showed the same variations in TRH metabolism described above: lower expression of pro-TRH in PVN of FFR animals ($54 \pm 4\%$) and higher in DIA group ($147 \pm 10\%$) than naïve ($100 \pm 6\%$) and FFR. To evaluate the response to cold exposure, data were calculated as % of the naïve values at room temperature. As previously observed measuring pro-TRH mRNA levels by northern blots (Unbe et al., 1993), by *in situ* hybridization (Sánchez et al., 2001), or by RT-PCR (Sánchez et al., 2007), its expression increased in cold-exposed naïve rats. Levels were also enhanced in FFR animals, with the highest response in this group, while no additive response was found in DIA animals exposed to cold (Fig. 4) [two-way ANOVA showed significance between feeding conditions ($F_{(2,42)}=3.76$, $p<0.05$), temperature ($F_{(1,42)}=42.21$, $p<0.0001$), and interaction between feeding conditions and cold response ($F_{(2,42)}=29.06$, $p<0.0001$)].

TSH serum levels were high only in cold naïve animals vs. RT naïve (Fig. 4) [two-way ANOVA showed significance between different feeding conditions ($F_{(2,21)}=8.39$, $p<0.001$), no difference between temperature conditions ($F_{(1,21)}=2.26$, $p>0.05$), neither interaction between feeding conditions and cold response ($F_{(2,21)}=0.85$, $p>0.05$)]. In contrast, levels of T_4 increased in all groups but were highest in DIA cold rats vs. RT, while the levels of T_3 increased, to a similar extent in FFR and DIA cold but not in naïve cold (Fig. 4) [T_4 : two-way ANOVA showed significance between feeding conditions ($F_{(2,18)}=130.83$, $p<0.0001$), temperatures ($F_{(1,18)}=63.64$, $p<0.0001$), interaction ($F_{(2,18)}=8.14$, $p<0.01$; $n=4$); T_3 : significance between feeding conditions ($F_{(2,18)}=34.01$, $p<0.0001$), temperatures ($F_{(1,18)}=58.69$, $p<0.0001$), interaction was not significant; $n=4$]. The ratio of T_4/T_3 slightly increased in

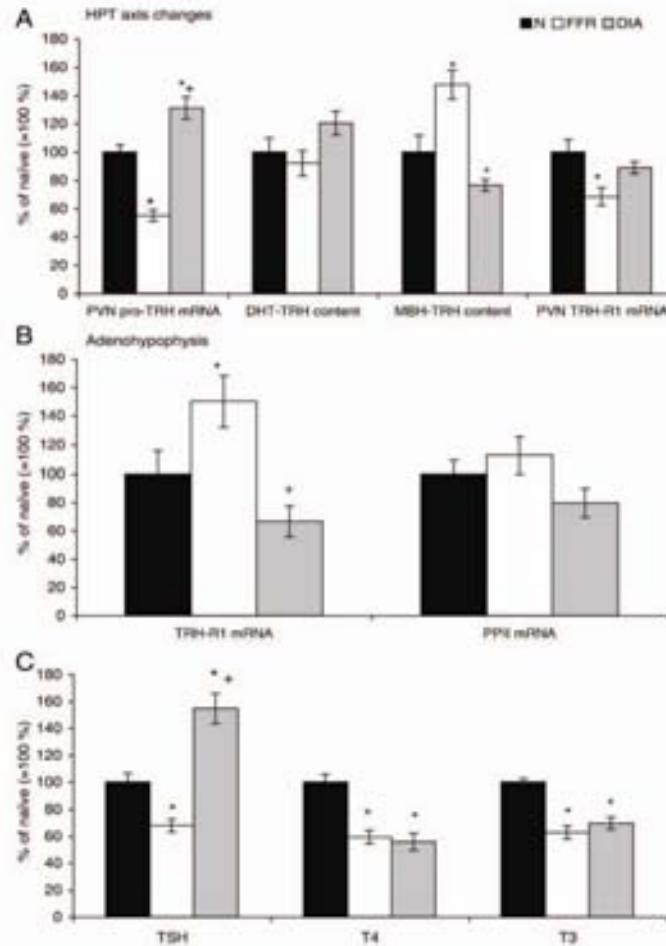


Fig. 3. Effect of 7 days of dehydration-induced anorexia on the HPT axis. Values are expressed as % of Naive ($N=100\%$). (A) pro-TRH or TRH-R1 mRNA levels, semi-quantified by RT-PCR and related to cyclophilin mRNA, in the PVN of naive (N), force-food restricted (FFR) and dehydration-induced anorexic (DIA) animals ($n=16$). TRH content measured by RIA in the dorsal (DHT) or in the medial-basal hypothalamus (MBH) ($n=8$). (B) TRH-R1 and PPI mRNA levels in adenohypophysis, semi-quantified by RT-PCR and related to cyclophilin mRNA ($n=10$). (C) Serum hormone levels of TSH, total T₄ and T₃; values are ng/ml, $\mu\text{g/dl}$ and ng/dl respectively and expressed as the mean \pm SEM of % of naive ($N=100\%$). (TSH, N: 2.1 ± 0.22 ng/ml, $n=40$; T₄, N: 1.94 ± 0.27 $\mu\text{g/dl}$, $n=19$; and T₃, N: 73 ± 4.7 ng/dl, $n=19$). One-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc test showed significant differences when * $p < 0.05$ vs. Naive, + vs. FFR.

cold-exposed naive animals ($+29 \pm 7\%$) compared to those kept at room temperature; in contrast, FFR animals had a 52.5% decrease compared to FFR animals at room temperature ($p < 0.05$); the values of DIA group did not change. No significant changes were found in prolactin levels in animals submitted to cold (data not shown).

Corticosterone serum levels increased in all groups exposed to cold compared to animals kept at room temperature (Fig. 4) [two-way ANOVA showed significance between feeding conditions ($F_{(2,23)}=13.02$, $p < 0.001$), temperature ($F_{(1,23)}=$

57.71 , $p < 0.0001$), and interaction between feeding conditions and cold exposure ($F_{(2,23)}=6.83$, $p < 0.05$)].

As TRHergic neurons of DIA rats exposed to cold showed a blunted response to cold exposure, in contrast to that of the FFR group, despite both having a diminished response in corticosterone release, we analyzed if this could be due to a difference in the stress response of the animals. This was assessed in the defensive-burying test (DBT) that evaluates the anxiety-like behavior. A group of naive, FFR and DIA rats were exposed to DBT on day 3, when forced or voluntary food intake was

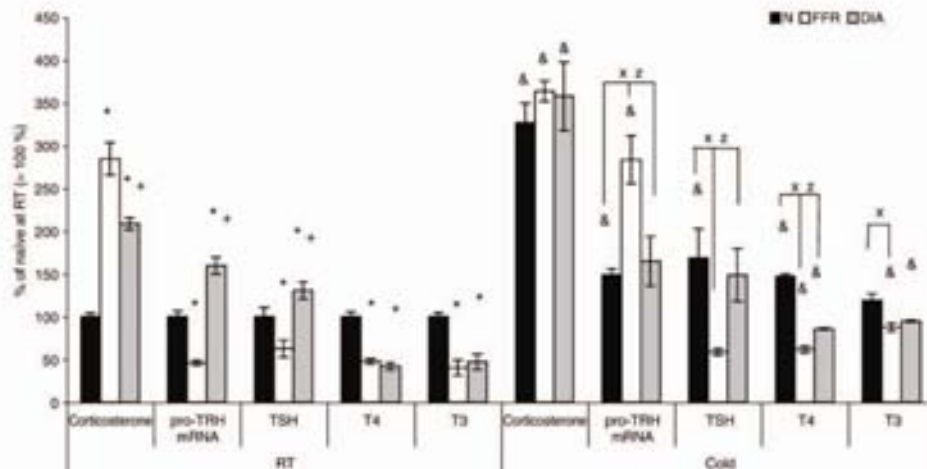


Fig. 4. Effect of cold exposure on the HPT axis of anorexic or forced-food restricted rats. Ten rats per group were subjected to forced-food restriction or dehydration-induced anorexia; on the 7th day, 5 animals/group were maintained at room temperature (RT) and the rest exposed to 4 °C during an hour. Pro-TRH expression in the PVN of cold-exposed naive (Cold N), forced-food restricted (Cold FFR) and dehydrated (Cold DIA) animals, semi-quantified by RT-PCR. Values are the ratio of pro-TRH cDNA/cyclophilin, cDNA signal expressed as the mean \pm SEM calculated as % of the naive values group kept at room temperature. Corticosterone, TSH, total T₄ and T₃ serum levels analysed by RIA (Corticosterone: N-RT=145 \pm 7 ng/ml, n=5; TSH: N-RT=1.5 \pm 0.17 ng/ml, n=5; T₄: N-RT=2.3 \pm 0.14 μ g/dl, n=4; T₃: N-RT=86 \pm 5 ng/dl, n=4). Two-way ANOVA followed by a Fisher's post-hoc test showed significant differences when $p < 0.05$: * significant vs. Naive-RT; + significant vs. FFR-RT; & significant vs. its own control group at room temperature; x: significant differences between Cold naive and Cold FFR; z: significant differences between Cold FFR and Cold DIA.

reduced to 39% compared to naive, T₃ levels were diminished but pro-TRH mRNA expression was not yet affected (Fig. 2). Latency to bury the electrode, that represents the reactivity of the animal to the aversive stimulus, was similarly decreased in FFR and DIA rats compared to naive (N=90 \pm 14, FFR=52 \pm 4, DIA=51 \pm 6.6 sec [$F_{(2,26)}=5.74, p < 0.01$]). The cumulative time the animals spent burying the probe, considered to reflect anxiety, was higher than naive in DIA; FFR showed a tendency to increase but did not achieve statistical significance compared to either naive or DIA (N=151 \pm 17, FFR=199 \pm 24, DIA=247 \pm 21 sec [$F_{(2,26)}=4.83, p=0.01$]). The number of shocks received was similar in the 3 groups (N=3 \pm 0.4, FFR=3 \pm 0.4, DIA=3 \pm 0.5 shocks [$F_{(2,26)}=0.27, p=0.75$]) implying that the differences in behavioral parameters were due to the animals' anxiety levels. These results suggest that at this time, FFR and DIA were more anxious than normally fed animals.

Discussion

Female rats subjected to dehydration-induced anorexia presented alterations previously reported in DIA-male rats (Watts et al., 1999) that were similar to those provoked by equivalent forced-food restriction: decreased body and WAT weight, leptin serum concentrations, and pro-CRH expression in the PVN, as well as increased corticosterone serum levels (Watts et al., 1999). The higher corticosterone concentration could be due to a lower catabolic rate of glucocorticoids in the liver that occur during negative energy balance (Woodward et al., 1991). The HPT axis function of the FFR group showed

the expected tertiary hypothyroid condition induced by lowered energy availability: low TSH, T₄ and T₃ serum levels, decreased pro-TRH mRNA expression in the PVN, and increased TRH content in the median eminence that suggests inhibited release (Rondeel et al., 1992; Shi et al., 1993; van Haasteren et al., 1995, 1996; de Gortari et al., 2000). By contrast, HPT axis of anorexic animals failed to show this adaptations developing primary hypothyroidism: increased pro-TRH mRNA levels in the PVN, enhanced peptide release (inferred by decreased TRH content in median eminence and TRH-R1 expression in the adenohypophysis), and increased TSH release, but low T₄ and T₃ serum concentrations.

One caveat of dissection studies is that they include other neuronal types as the magnocellular cells of the PVN, or surrounding tissue that could influence the results. In the case of CRH for example, pro-CRH expressing magnocellular neurons are stimulated by dehydration (Watts et al., 1995; Kay-Nahiyama and Watts, 1999) however, levels were not significantly different between DIA vs. FFR animals but reduced in both, compared to controls, as previously reported using *in situ* hybridization analyses (Watts et al., 1999). In the case of TRH content, increased particularly in the FFR group and interpreted as decreased release, caution should be raised as the MBB section contained all the median eminence but parts of other TRH enriched hypothalamic areas such as ARH, and the anterior hypothalamic area whose afferents are yet unknown. It is however the ensemble of the determinations of the different elements involved in HPT axis function that allows to infer the state of its activity.

Assuming thus, that the measurement of pro-TRH levels represents to a good extent, the hypophysiotropic neurons, the difference in pro-TRH expression between FFR and DIA cannot be explained by variation in leptin levels as they were lowered, to the same extent, in both groups. Neither, to impaired expression of important regulatory peptides in the arcuate nucleus as NPY mRNA levels are increased and those of POMC decreased to the same extent in dehydrated and forced-food restricted animals (Watts et al., 1999). Since both groups presented a similar level of hypercortisolemia that could inhibit pro-TRH expression in the PVN (van Haasteren et al., 1995; Kakacsika et al., 1995), a different mode of regulation of TRH metabolism in PVN is evident in DIA animals. A possible element could be a differential regulation of the hypothalamic deiodinase II (DII) by dehydration vs. forced-food restriction setting local levels of T₃ that can modulate pro-TRH mRNA expression. For example, DII activity and expression are increased during fasting, from the combined effects of decreased leptin and increased corticosterone levels (Bianco et al., 2002; Coppola et al., 2005) but, in conditions such as LPS injection, DII expression is increased in the hypothalamus independent of circulating thyroid and glucocorticoid hormones (Fekete et al., 2005). Since FFR and DIA have similar changes in leptin and corticosterone, other factors of probable neuronal nature, could be involved.

As TRHergic neurons receive CRH afferents (Hisano et al., 1993), it is tempting to speculate that activation of lateral hypothalamic CRH neurons, specifically provoked by cellular dehydration stimulus that project to the PVN (Watts et al., 1999), override inhibitory influences produced by low energy intake. This is supported by the inhibitory effect of CRH injected into the PVN that impedes the NPY-induced feeding (Menzaghi et al., 1993; Heinrichs et al., 1993) which would normally diminish pro-TRH expression (Fekete et al., 2001). If the increased pro-TRH mRNA levels in the PVN of DIA animals are also related to the anorexic effect observed after central administration of TRH (Choi et al., 2002) remains to be shown.

Results of the analysis of adenyophysical parameters suggest that TRH release from the median eminence in DIA animals was normal, while decreased in FFR. Changes in TRH release are inferred by that the ability of TRH to down-regulate the expression of adenyophysical TRH-R1 receptor (Narayanan et al., 1992; Yu and Hinkle, 1998), while hormones as estradiol enhance and thyroid hormones decrease it (Hinkle et al., 1981; Yamada et al., 1992; Kimura et al., 1994; Schomburg and Bauer, 1995). TRH-R1 mRNA levels were higher in the AH of the FFR group than in DIA or naïve not coincident with the hormonal profile of the 3 groups suggesting thus, a decreased TRH release in FFR while normal in DIA. This is further supported by the higher levels of serum TSH found in anorexic animals and normal prolactin levels in DIA, given the importance of TRH in regulating prolactin synthesis and release (Grossvenor and Mesa, 1980; Freeman et al., 2000). Decreased levels of prolactin in FFR coincides with previous reports (Koizumi et al., 1992) and the differences in prolactin levels cannot be attributed to estradiol serum concentration (Freeman et al., 2000) that was similarly diminished in both experimental groups.

Effect of cold exposure

We were interested in studying whether the lack of adaptation of the HPT axis shown in dehydrated-induced anorexic animals could affect the response of TRH neurons and HPT function to an acute stimulus like cold. TRHergic neurons in the PVN are activated by cold exposure increasing transiently pro-TRH expression, and release of TSH and TH, but not that of prolactin (Arancibia et al., 1996; Pacak and Palkovits, 2001; Sánchez et al., 2001, 2007). Despite diminished pro-TRH expression by forced-food restriction, the responsiveness to the cold insult was not only preserved but was higher than naïve, as the magnitude of increased PVN pro-TRH mRNA levels were higher than their respective controls kept at room temperature. *In situ* hybridization analysis is required to distinguish if the observed differences in the response of TRHergic neurons in the PVN correspond to hypophysiotropic neurons or, to those in the rostral PVN that also are stimulated by cold exposure but are not involved in HPT axis regulation (Sánchez et al., 2001, 2007).

The increase in pro-TRH mRNA levels of cold-exposed DIA animals was not significantly different from the already increased values (compared to naïve) of those kept at room temperature. These results demonstrate that DIA blunts the response of TRHergic neurons. The effect of cold on pro-TRH mRNA levels has proven independent of thyroid hormones (Zoeller et al., 1990) and mediated by noradrenergic stimulation (Arancibia et al., 1996). Norepinephrine increases TRH transcription in hypothalamic cell cultures and this effect can be interfered by corticosterone (Cote-Velez et al., 2005). However, the lack of response of DIA rats exposed to cold cannot be attributed to corticosterone release as naïve animals showed the highest increase in corticosterone levels after cold exposure compared to either FFR or DIA animals.

Cold exposure represents a type of physical stressor where signals arising from the brain stem impinge directly to the PVN activating the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis; psychological stressors in contrast, involve limbic areas that activate or modify the response of the HPA axis that can be susceptible to previous experience (Helmreich et al., 1999; Pacak and Palkovits, 2001; Makino et al., 2002; Mizoguchi et al., 2003; Herman et al., 2005). As pro-TRH expression is inhibited by psychological stimuli such as immobilization (Pacak and Palkovits, 2001), we tested the behavior to an aversive stimulus (defensive-burying test [DBT]) to study if there were differences between the two models of food restriction that could account for the impaired response of DIA-TRHergic neurons to cold exposure. However, although FFR and DIA rats were more anxious than naïve, their anxiety-like behavior was not significantly different, leaving thus the problem opened to evaluate other factors specifically modulated by DIA. Different neuronal networks and brain regions are known to participate in the control of feeding behavior (Berthoud, 2002) and the PVN, that regulates metabolic rate and energy expenditure, is also recognized as a crucial part of the controlling network of food intake behavior by decoding signals from neurons of the ARH, limbic regions, brain stem and the LH, whose projections to the PVN allow control of spontaneous food

seeking behavior (Berthoud, 2002; Wynne et al., 2005; Wats et al., 2007). The differential modulation found between the forced-food restriction paradigm and DIA supports thus, a role of LH-CRH afferents as they are the only ones specifically affected by DIA (Watts et al., 1999). In this regard, preliminary results show a stimulatory effect of CRH in hypothalamic primary cell culture on pro-TRH mRNA levels (unpublished).

Only cold-exposed naïve rats had significant increments in TSH levels at the times studied. DIA and FFR animals could be showing a delayed TRH response, similar to the blunted TSH-TRH induced release of anorexic patients (Muñoz and Argente, 2002). As previously reported, prolactin levels were not affected by cold stimulation in naïve (Sánchez et al., 2007), FFR or DIA groups. The dynamics of thyroid hormone release also differed. Cold exposure provoked an increased release of T_4 in all but strongest in DIA, while that of T_3 augmented only in FFR and DIA. Acute cold exposure induces the activity of deiodinase I (DI) in liver (Reed et al., 1994; Lisboa et al., 2003) and DI1, strongly in BAT (Silva and Larsen, 1983) but decreases that of the thyroid (Lisboa et al., 2003). The increase in T_3 levels after only 1 h of cold exposure found in FFR and DIA rats suggests a preferential activation of deiodinases in these groups that could be due to the increased sympathetic activity and accelerated norepinephrine turnover observed in hypothyroid animals (Bianco et al., 2005; Silva, 2006).

We can conclude that under similar energy deficiency, low thyroid hormone levels were apparent in both FFR and DIA animals, but the type of hypothyroidism differed, tertiary in FFR as reported (Blake et al., 1991; Shi et al., 1993; de Goertel et al., 2000) and primary in DIA, evident by the increased expression of pro-TRH in the PVN and TSH release. The factors involved in the differential response between FFR and DIA animals remain to be elucidated since either leptin, estradiol and corticosterone content was similarly affected [these results and Watts et al., 1999, as are the signals of the arcuate nucleus, NPY or POMC (Watts et al., 1999)]. The combined stimuli of cellular dehydration and sensorial signals, like the taste of salt induced a specific response of HPT axis. The higher loss of body weight observed in this model of anorexia when compared to FFR suggests tissue-specific alterations in thyroid hormone utilization, probably by differential activity of tissue deiodinases. Although the animal model used here is not necessary reflecting alterations appearing in anorexia nervosa, the failure of the HPT-axis found in DIA group to adapt to energy deficiency, resembles those found in anorexic patients and could explain the risk of high loss of body weight.

The neuronal response to cold exposure was blunted in DIA animals: pro-TRH mRNA levels in the PVN did not increase when compared to its control values at room temperature, but the delayed response of TSH release seemed compensated by increased T_4 conversion to T_3 .

Acknowledgments

The technical assistance of M. Cisneros and Isabel Amaya is greatly acknowledged. And the assistance of Lucía Martínez Mota, PhD in the performance of the defensive-burying test.

This work was supported by CONACYT 45131 (PMG), 43503-Q (PJB) and DGAPA IN222603 (PJB).

References

- Aguiar-Valles, A., Sanchez, E., de Goertel, P., Balcells, I., Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2005. Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 82, 306–319.
- Ahima, R.S., Ostr, Y., 2004. Leptin signaling. *Physiol. Behav.* 31, 223–241.
- Arancibia, S., Rago, F., Antier, H., Tapia-Arancibia, L., 1996. Neuroendocrine and autonomic mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* 61, 257–267.
- Berthoud, H.R., 2002. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 393–428.
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, F.R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenoenzymes. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.
- Bianco, A.C., Maia, A.L., da Silva, W.S., Christofolini, M.A., 2005. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *BioSci. Rep.* 25, 191–208.
- Blake, N.G., Eckland, D.J., Foster, O.J., Lightman, S.L., 1991. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129, 2714–2718.
- Brady, L.S., Smith, M.A., Gold, P.W., Herkenham, M., 1990. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 52, 441–447.
- Brenella, F., Santonastaso, F., Cangiano, L., Favaro, A., 2006. Disorders of eating behavior: correlation between hypothalamo-pituitary-thyroid function and psychopathological aspects. *Psychoneuroendocrinology* 31, 131–136.
- Broberger, C., 1999. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res.* 848, 101–113.
- Chalmers, D.T., Lovenberg, T.W., De Souza, E.B., 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 6340–6350.
- Choi, Y.H., Hartzell, D., Azzin, M.J., Balle, C.A., 2002. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol. Behav.* 77, 1–4.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation: by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Chrousos, G.P., 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuroendocrine and target tissue-related causes. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 24 (Suppl. 2), S50–S55.
- Cirza, G., Brady, L.S., Pacak, K., Blackman, M.R., Gold, P.W., Chrousos, G.P., 1995. Stress-induced inhibition of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis is attenuated in the aged Fischer 344/N male rat. *Neuroendocrinology* 62, 506–513.
- Conran, F., Campbell, I.C., Katzman, M., Lightman, S.L., Treasure, J., 2003. A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol. Behav.* 79, 13–24.
- Coppola, A., Meli, R., Diano, S., 2005. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146, 2827–2833.
- Cote-Velez, A., Perez-Martinez, L., Diaz-Gallardo, M.Y., Perez-Monter, C., Carron-Rodriguez, A., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2005. Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 177–197.
- De Boer, S.F., Koellaas, J.M., 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 145–161.

- de Gortari, P., Fernández-Guardiola, A., Martínez, A., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., 1995. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutaminyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res.* 679, 144–150.
- de Gortari, P., González-Alzati, M.E., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., 2000. Effect of fasting on the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutaminyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Neurosci. Lett.* 285, 255–265.
- de Gortari, P., Uribe, R.M., García-Vázquez, A., Aguilar-Valles, A., Martínez, A., Valdes, A., Charli, J.L., Fernández-Guardiola, A., Joseph-Bravo, P., 2006. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem. Lett.* 48, 31–42.
- Fekete, C., Kelly, J., Mihaly, E., Sarkar, S., Ranzó, W.M., Legrá, G., Emerson, C.H., Lechan, R.M., 2001. Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic–pituitary–thyroid axis. *Endocrinology* 142, 2606–2613.
- Fekete, C., Sarkar, S., Ranzó, W.M., Harney, J.W., Emerson, C.H., Bianco, A.C., Beck-Sickingler, A., Lechan, R.M., 2002. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic–pituitary–thyroid axis. *Endocrinology* 143, 4513–4519.
- Fekete, C., Marks, D.L., Sarkar, S., Emerson, C.H., Ranzó, W.M., Cone, R.D., Lechan, R.M., 2004. Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knock-out mouse. *Endocrinology* 145, 4816–4821.
- Fekete, C., Sarkar, S., Christoffolete, M.A., Emerson, C.H., Bianco, A.C., Lechan, R.M., 2005. Bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced type 2 iodothyronine deiodinase (D2) activation in the mediobasal hypothalamus (MBH) is independent of the LPS-induced fall in serum thyroid hormone levels. *Brain Res.* 1056, 97–99.
- Freeman, M.E., Karyciak, B., Lesant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 80, 1523–1631.
- Grove-Stein, C.E., Mena, F., 1980. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107, 863–868.
- Gutiérrez-Mariscal, M., de Gortari, P., López-Rubalcava, C., Martínez, A., Joseph-Bravo, P., submitted for publication. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdala TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. doi:10.1016/j.psyneuro.2007.11.002.
- Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C.F., Charalambous, A., Nilni, E.A., Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Flier, J.S., Hollenberg, A.N., 2001. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.* 107, 111–120.
- Heinrichs, S.C., Metzger, F., Pich, E.M., Hauger, R.L., Koob, G.F., 1993. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* 611, 18–24.
- Heinrichs, D.L., Watkins, L.R., Deak, T., Maier, S.F., Aki, H., Watson, S.J., 1999. The effect of stressor controllability on stress-induced neuropeptide mRNA expression within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 11, 121–128.
- Herman, J.P., Ostlund, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1201–1213.
- Hinkle, P.M., Perrone, M.H., Schonbrunn, A., 1981. Mechanism of thyroid hormone inhibition of thyrotropin-releasing hormone action. *Endocrinology* 108, 199–205.
- Hisano, S., Fukui, Y., Chikamori-Aoyama, M., Aizawa, T., Shibasaki, T., 1993. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive- and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 620, 343–346.
- Kakacska, I., Qi, Y., Lechan, R.M., 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 136, 2795–2802.
- Karydis, I., Tolia, G., 1998. Obesity, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid* 8, 947–950.
- Kay-Nishiyama, C., Wata, A.G., 1999. Dehydration modifies somal CRH immunoreactivity in the rat hypothalamus: an immunocytochemical study in the absence of orelidine. *Brain Res.* 822 (1–2), 251–255.
- Kimura, N., Arai, K., Sahara, Y., Suzuki, H., Kimura, N., 1994. Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells. *Endocrinology* 134, 432–440.
- Koizumi, A., Tsukada, M., Masuda, H., Kamiyama, S., Walford, R.L., 1992. Specific inhibition of pituitary prolactin production by energy restriction in CHUSHIN female mice. *Mech. Ageing Dev.* 64, 21–35.
- Lechan, R.M., Fekete, C., 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* 153, 209–235.
- Leibowitz, S.F., Wortley, K.E., 2004. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 25, 473–504.
- Lesem, M.D., Kaye, W.H., Bisette, G., Jimerson, D.C., Neuneroff, G.B., 1994. Cerebrospinal fluid TRH immunoreactivity in anorexia nervosa. *Biol. Psychiatry* 35, 48–53.
- Linha, P.C., Oliveira, K.J., Cabanelas, A., Ortega-Carvalho, T.M., Páez-Moura, C.C., 2003. Acute cold exposure, leptin, and somatostatin analog (octreotide) modulate thyroid 5'-deiodinase activity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E1172–E1176.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Makino, S., Hashimoto, K., Gold, P.W., 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 147–158.
- Menard, J., Treit, D., 1999. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 591–613.
- Metzger, F., Heinrichs, S.C., Pich, E.M., Tilders, F.J., Koob, G.F., 1993. Functional impairment of hypothalamic corticotropin-releasing factor neurons with immunotargeted toxins enhances food intake induced by neuropeptide Y. *Brain Res.* 618, 76–82.
- Michel, C., Duclos, M., Cabanac, M., Richard, D., 2005. Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Horm. Behav.* 48, 172–179.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., Tabira, T., 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887–897.
- Mouzon, K.G., Muehrst, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., Cone, R.D., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298–1308.
- Mizuo, M.T., Argente, J., 2002. Anorexia nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 275–286.
- Narayanan, C.S., Fujimoto, J., Gera-Raska, E., Gerschlager, M.C., 1992. Regulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) of TRH receptor mRNA degradation in rat pituitary GRD cells. *J. Biol. Chem.* 267, 17296–17303.
- Nilni, E.A., Valet, C., Harris, M., Hollenberg, A., Bjorbaek, C., Flier, J.S., 2000. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 36124–36133.
- Pacak, K., Falkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502–548.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 5th Edition. Elsevier, USA.
- Reed, H.L., Quesada, M., Hesolink Jr, R.L., D'Alessandro, M.M., Hays, M.T., Christopherson, R.J., Turner, B.V., Young, B.A., 1994. Changes in serum triiodothyronine kinetics and hepatic type I 5'-deiodinase activity of cold-exposed swine. *Am. J. Physiol.* 266, E786–E795.
- Rondeel, J.M., Heide, R., de Greef, W.J., van Toor, H., van Haasteren, G.A., Klootwijk, W., Visser, T.J., 1992. Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 56, 348–353.
- Sánchez, E., Uribe, R.M., Corkidi, G., Zoeller, R.T., Cisneros, M., Zacarias, M., Morales-Chapa, C., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2003. Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 74, 407–422.

- Sleebaz, E., Fekete, C., Lechan, R.M., Joseph-Bravo, P., 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expression is differentially regulated in the hypothalamic paraventricular nucleus of lactating rats exposed to suckling or cold stimulation. *Brain Res.* 1132, 120–128.
- Schomburg, L., Bauer, K., 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136, 3480–3485.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Camplfield, L.A., Bum, P., Haskin, D.G., 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J. Clin. Invest.* 98, 1101–1106.
- Shi, Z.X., Levy, A., Lightman, S.L., 1993. The effect of dietary protein on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin gene expression. *Brain Res.* 606, 1–4.
- Sieghart, Z., Berry, E.M., Hao, S., Avshalom, Y., 2003. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiol. Behav.* 79, 39–45.
- Silva, J.H., 2006. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 86, 435–464.
- Silva, J.H., Larsen, P.R., 1983. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305, 712–713.
- Stewart, C.A., Hoss, T.L., Schilder, S., Bennett, G.W., Ehling, F.J., 2003. Central administration of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and related peptides inhibits feeding behavior in the Siberian hamster. *NeuroReport* 14, 687–691.
- Striving, R.K., Hargnani, J., Hager, C., 2001. Update on endocrine disturbances in anorexia nervosa. *J. Psychiatr. Endocrinol. Metab.* 14, 459–480.
- Suzuki, T., Kohno, H., Sakurada, T., Tadano, T., Kusano, K., 1982. Intracranial injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17, 249–253.
- Tanai, H., Mori, K., Matsuyoshi, S., Kiyohara, K., Nakagawa, T., Okimura, M.C., Walter Jr, R.M., Kumagai, I.F., Nagasaki, S., 1986. Hypothalamic-pituitary-thyroidal dysfunction in anorexia nervosa. *Psychosom. Psychosom.* 46, 127–131.
- Treit, D., Pinal, J.P., Flügler, H.C., 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 619–626.
- Troisi, A., Di Lorenzo, G., Lega, I., Tesaro, M., Bertoli, A., Leo, R., Iannone, M., Preckloli, C., Rizza, S., Turiziani, M., Lacro, R., Siracusano, A., 2005. Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 81, 259–266.
- Urbe, R.M., Redondo, J.L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58, 140–145.
- van Haasteren, G.A., Linkels, E., Klootswijk, W., van Toor, H., Rondeli, J.M., Thammam, A.P., de Jong, F.H., Valmijn, K., Vauzry, H., Hazer, K., Visser, T.J., de Greef, J., 1995. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotropin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J. Endocrinol.* 145, 143–153.
- van Haasteren, G.A., Linkels, E., van Toor, H., Klootswijk, W., Kaptein, E., de Jong, F.H., Reynoud, M.J., Visser, T.J., de Greef, W.J., 1996. Effects of long-term food restriction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J. Endocrinol.* 150, 169–178.
- Vijayan, E., McCann, S.M., 1977. Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 100, 1727–1730.
- Watts, A.G., 2001. Neuropeptides and the integration of motor responses to dehydration. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 357–384.
- Watts, A.G., Kelly, A.B., Sanchez-Watts, G., 1995. Neuropeptides and thirst: the temporal response of corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y/neurokinin B gene expression in rat limbic forebrain neurons to drinking hypertonic saline. *Behav. Neurosci.* 109, 1146–1157.
- Watts, A.G., Sanchez-Watts, G., Kelly, A.B., 1999. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J. Neurosci.* 19, 6111–6121.
- Watts, A.G., Saiter, D.S., Neuner, C.M., 2007. Neural network interactions and ingestive behavior control during anorexia. *Physiol. Behav.* 91, 389–396.
- Woodward, C.J., Harvey, G.R., Oakley, R.E., Whitaker, E.M., 1991. The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats. *Br. J. Nutr.* 66, 117–127.
- Wyne, K., Stanley, S., McGowan, B., Bloom, S., 2005. Appetite control. *J. Endocrinol.* 184, 291–318.
- Yamada, M., Monden, T., Satoh, T., Iizuka, M., Mankami, M., Iriuchijima, T., Mori, M., 1992. Differential regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA levels by thyroid hormone in vivo and in vitro (GR1 cells). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 367–372.
- Yu, R., Hinkle, P.M., 1998. Signal transduction, desensitization, and recovery of responses to thyrotropin-releasing hormone after inhibition of receptor internalization. *Mol. Endocrinol.* 12, 737–749.
- Zoeller, R.T., Kaber, N., Albers, H.E., 1990. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* 127, 2955–2962.