



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EL PAPEL DE LA DESYODASA 2 Y DE LA PIROGLUTAMIL AMINOPEPTIDASA II EN
LA REGULACIÓN DE LAS NEURONAS TRHÉRGICAS DEL NÚCLEO
PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO EN RATAS SOMETIDAS A ANOREXIA POR
DESHIDRATACIÓN

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

ELENA ALVAREZ SALAS

TUTOR PRINCIPAL: DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO
FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. PATRICIA JOSEPH BRAVO INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA (UNAM)
DRA. LOURDES MASSIEU TRIGO INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR (UNAM)

MÉXICO, D. F. Marzo, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	3
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. ANTECEDENTES.....	7
1. Funcionamiento del eje Tiroideo	7
1.2 Papel de las hormonas tiroideas.....	8
2. Enzimas desyodasas.....	11
2.1 Desyodasa tipo 1	11
2.2 Desyodasa tipo 2	12
2.3 Desyodasa tipo 3	15
3. Regulación del balance energético	17
3.1 Adaptaciones del eje HPT en respuesta al balance energético negativo	17
4. Anorexia	19
4.1 Anorexia por deshidratación	20
4.1.1 Respuesta al frío	22
V. JUSTIFICACIÓN.....	25
VI. HIPÓTESIS.....	27
VII. OBJETIVO PRINCIPAL	28
VIII. OBJETIVOS PARTICULARES	28
IX. MATERIAL Y MÉTODOS	29
Animales.....	29
Experimentos 1-4.	29
Hibridación <i>in situ</i> con cRNA de D2, pro-TRH y con oligos del mRNA de PPII, D3 y MCT-8..	30
Fijación de tejidos.....	30
Hibridación <i>in situ</i> (ISH) sencilla.....	30
Hibridación <i>in situ</i> doble (ISHd).....	31
Análisis de imágenes	32
Experimento 5	33
Identificación de las neuronas TRHérgicas no-hipofisiotrópicas del PVN	33
Análisis de imágenes	33
Experimento 6.	34

Extracción de RNA y semicuantificación por RT-PCR.....	34
Análisis hormonales.....	35
Radioinmunoensayo de T ₃	35
Radioinmunoensayo de T ₄	36
Radioinmunoensayo de TSH.....	36
ELISA de vasopresina.....	37
Análisis de actividad enzimática.....	38
Método de liberación de radioyodo para determinación de la actividad de desyodasas.....	38
Método fluométrico para determinación de la actividad de la PPII.....	39
Análisis de resultados.....	40
X. RESULTADOS.....	41
Consumo de alimento.....	41
Peso.....	42
Eje tiroideo.....	42
Actividad de desyodasas periféricas.....	43
Concentración de AVP sérica y expresión en PVN.....	44
Expresión del mRNA de pro-TRH en el PVN.....	44
Naturaleza de las neuronas TRHérgicas del PVN.....	46
Colocalización de los mRNAs de MCT-8 y TRH en el PVN.....	48
Actividad y expresión de D2 en el MBH.....	50
Expresión del mRNA de D3 en el PVN.....	51
Actividad y expresión de PPII en el MBH.....	52
Resumen de resultados.....	53
XI. DISCUSIÓN.....	54
Consumo de alimento y peso corporal.....	54
Eje tiroideo.....	54
Actividad de las desyodasas periféricas.....	56
Expresión del mRNA de pro-TRH en el PVN.....	58
Naturaleza no hipofisiotrópica de las neuronas del PVNa activadas en anorexia.....	60
Actividad y expresión de D2 en el MBH.....	60
Expresión del mRNA de D3 en el PVN.....	61
Co-expresión de los mRNAs de pro-TRH y MCT-8 en el PVN.....	61
Actividad y expresión de PPII en el MBH.....	62

XII. CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS	80

Artículo publicado en la revista Endocrinology

“Food-Restricted and Dehydrated-Induced Anorexic Rats Present Differential TRH Expression in Anterior and Caudal PVN. Role of Type 2 Deiodinase and Pyroglutamyl Aminopeptidase II “
Endocrinology. 2012 Aug;153(8):4067-76. Epub 2012 Jun 19. PMID: 22719053

5'D Desyodasas del anillo externo de las iodotironinas
 α -MSH Hormona estimulante de los α -melanocitos
 β NA β -naftilamina
AgRP Proteína relacionada al agouti
AN Anorexia inducida por deshidratación
ANOVA Análisis de varianza
AP Adenohipófisis
ARC Núcleo arcuato del hipotálamo
AVP Arginina Vasopresina
BAT Tejido adiposo pardo
BHE Barrera hematoencefálica
BSA Albúmina bovina sérica
CORT Corticosterona
CRH-R2 Receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina
D1 Desyodasa tipo 1
D2 Desyodasa tipo 2
D3 Desyodasa tipo 3.
DMH Núcleo dorsomedial del hipotálamo
EM Eminencia media
ESM Error estándar de la media
FCE Fluido cerebro espinal
 ft_3 Triyodotironina libre
GEB Gasto energético basal
HL Hipotálamo lateral
HPT Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
HT Hormonas tiroideas
i.c.v. Intracerebroventricular
ISH Hibridación *in situ*
ISHd Hibridación *in situ* doble

MBH Hipotálamo medio basal
MCT Transportador monocarboxilato
NPY Neuropeptido Y
OATP Familia de proteínas transportadoras de aniones orgánicos
POMC Pro-opiomelanocortina
PPII Piroglutamil aminopeptidasa II
PTU 6-*n*-propil-2-tiouracilo
PVN Núcleo paraventricular del hipotálamo
RAF Restricción alimentaria forzada
RIA Radioinmunoensayo
RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
rT₃ Triyodotironina reversa
SNC Sistema Nervioso Central
T₃ Triyodotironina
T₄ Tiroxina
TR Receptor nuclear a hormona tiroidea
TRE Elemento de respuesta a hormonas tiroideas
TRH Hormona liberadora de tirotropina
TRH-R1 Receptor 1 de la hormona liberadora de tirotropina
TSH Hormona estimulante de la tiroides o tirotropina
UCP-I Proteína desacopladora de la fosforilación oxidativa I
VMH Núcleo ventromedial del hipotálamo

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) sintetizada en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) es un péptido que actúa como responsable principal de la regulación del eje tiroideo y se ha considerado como un anorexigénico, ya que su inyección i.c.v. disminuye el consumo de alimento en ratas. En animales sometidos a condiciones de balance energético negativo como ayuno o restricción alimentaria, se observa una disminución en la expresión y liberación de TRH del PVN, menor concentración de tirotropina (TSH) y hormonas tiroideas (HT) en suero, y un aumento del apetito. El modelo de anorexia inducida por deshidratación (AN) es una herramienta útil para el estudio de los mecanismos implicados en el control de la ingestión de alimentos. En este modelo, se les ofrece a las ratas una solución de NaCl al 2.5% como agua de bebida durante 7 días, los animales presentan disminución importante de peso corporal; sin embargo, a pesar de su balance energético negativo los animales evitan la ingestión de alimentos, tienen un incremento en la expresión de TRH en PVN y de la concentración de TSH en suero. Estos hallazgos apoyan la participación de TRH del PVN en la inhibición del consumo de alimentos.

TRH se expresa en distintas subdivisiones del PVN, sin embargo, no todas las neuronas que lo sintetizan proyectan hacia la zona externa de la eminencia media (EM). Únicamente las neuronas TRHérgicas de la subdivisión periventricular y medial proyectan a la EM y liberan su contenido hacia la circulación porta-hipofisaria, y por lo tanto son hipofisiotrópicas. Así, la TRH sintetizada en la zona anterior del PVN no participa en el control del eje tiroideo y se ha implicado en la regulación de la homeostasis energética a través de sus efectos en el comportamiento, locomoción y termogénesis.

El objetivo general de este trabajo fue identificar la subdivisión del PVN con activación de las neuronas TRHérgicas en el modelo de anorexia por deshidratación y la búsqueda de algunos factores implicados en dicha activación, en particular y debido a su relación con el metabolismo y transporte de HT y en la degradación de TRH nos enfocamos en el estudio de la expresión y actividad de la desyodasa 2, la piroglutamil-aminopeptidasa 2 [PPII] y la expresión del transportador monocarboxilato 8 de HT (MCT8). Asimismo, evaluamos la participación de desyodasas periféricas en las diferencias de los cambios de peso y del funcionamiento del eje tiroideo de los mismos animales.

Se comparó por medio de la técnica de hibridación *in situ* (ISH), la expresión de TRH en diferentes subdivisiones del PVN, entre un grupo de ratas macho Wistar sometidos a AN vs. la de otro con restricción alimentaria forzada (RAF): estos son animales pareados al consumo de alimento del grupo AN. Se determinó el peso y consumo de alimento diariamente. Después de 7 días se sacrificó a los animales y se obtuvo el cerebro, adenohipófisis, hígado, tejido adiposo pardo (BAT), músculo esquelético de la extremidad inferior derecha y sangre troncal. En suero se determinó la concentración de TSH, HT y vasopresina. Debido a que las desyodasas pueden activar (desyodasas tipo 1 [D1] y tipo 2 [D2]) o inactivar (desyodasa tipo 3 [D3]) a las HT, se evaluó la actividad de estas enzimas en tejidos como hígado, músculo, BAT y adenohipófisis; así como la expresión y actividad de la D2 y de la PPII (enzima que inactiva específicamente a TRH) en el hipotálamo medio basal (MBH). Además, se determinó por ISH doble, la colocalización de TRH y el transportador de HT MCT-8 en el PVN.

El peso de los animales AN fue menor vs. el de RAF a pesar de que ambos grupos consumieron la misma cantidad de alimento, el aumento en la actividad de las desyodasas musculares en animales con anorexia podría ser responsable, al menos en parte, de esta diferencia debido a que son enzimas relacionadas con atrofia de los miocitos. Las desyodasas de BAT e hígado respondieron a las bajas concentraciones de HT en suero, ya que se encontraron aumentadas y disminuidas, respectivamente, en ambos grupos experimentales. En adenohipófisis, D1 y D2 presentaron cambios similares entre ellas y específicos para los grupos experimentales: disminuidas en RAF y aumentadas en AN; por lo que éstas posiblemente no son responsables del aumento de TSH en AN.

El mRNA de TRH aumentó en las subdivisiones anterior (PVNa) y medio caudal (PVNc) del PVN de animales AN, mientras que la expresión disminuyó en el PVN medial (PVNm) de ambos grupos experimentales. Estos resultados apoyan la participación de TRH del PVNa en la conducta de anorexia; mientras que la activación diferencial de neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas en el PVNc entre animales AN y RAF podría explicar la mayor liberación del péptido y las altas concentraciones de TSH en animales AN. La naturaleza no-hipofisiotrópica de las neuronas TRHérgicas del PVNa (activadas en ratas anoréxicas) se confirmó con la inyección i.p. del marcador retrógrado Fluorogold.

La menor colocalización de TRH y el transportador de HT MCT-8 en el PVNc de ratas AN puede estar implicada en el aumento de la expresión de TRH en esta región. Se presentó un aumento en la actividad de la D2 en MBH que pareció ser responsable de la disminución de la síntesis de TRH en el PVNm en ambos grupos experimentales, mientras que el incremento observado en la actividad de PPII del MBH en ratas AN, podría contrarrestar la mayor liberación de TRH que estas ratas presentan hacia la circulación porta-hipofisaria y, a tiempos más largos desde el inicio de la anorexia, promover la desaceleración del eje HPT.

En conclusión, la anorexia por deshidratación induce la activación de dos poblaciones de neuronas TRHérgicas provenientes de distintas subdivisiones del PVN y que son funcionalmente diferentes, una población es probablemente la responsable de la elevación en la concentración plasmática de TSH (PVNc) y la otra al parecer puede participar en la conducta de anorexia que tienen las ratas en el presente modelo (PVNa).

III. INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido que tiene un papel clave en la regulación de la homeostasis energética, no sólo a través de sus efectos en la función tiroidea llevada a cabo por las neuronas hipofisiotrópicas del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), sino también mediante efectos centrales en el comportamiento alimentario, termogénesis activación locomotora y regulación autonómica (1).

El PVN de las ratas está conformado por dos partes principales, las divisiones magnocelular y parvocelular. El tracto neurohipofisario hipotalámico magnocelular transporta vasopresina (AVP) y oxitocina a la hipófisis posterior o neurohipófisis. La sección parvocelular incluye varios subcompartimentos incluyendo las subdivisiones anterior, medial, periventricular, ventral, dorsal y lateral. Una gran población de neuronas de TRH inmunoreactivas están localizadas en las subdivisiones medial y periventricular parvocelulares, organizadas en una configuración triangular, simétrica a la parte dorsal del tercer ventrículo, mientras que neuronas que expresan TRH de la subdivisión anterior parvocelular están más dispersas (2).

Las células TRHérgicas de las subdivisiones parvocelulares del PVN se encuentran invadidas principalmente por neuronas catecolaminérgicas del tallo cerebral (3) y por axones pertenecientes a dos poblaciones neuronales diferentes del núcleo arcuato del hipotálamo (ARC). Dichas neuronas tienen funciones opuestas y responden a la concentración circulante de leptina: 1) neuronas que coexpresan los péptidos anorexigénicos hormona estimulante de los α -melanocitos y el transcrito regulado por cocaína y anfetamina (α -MSH/CART), que inhiben el consumo de alimentos, promueven la pérdida de peso e incrementan el gasto de energía (4) y 2) neuronas que coexpresan los péptidos orexigénicos neuropéptido Y y la proteína relacionada al agouti (NPY/AgRP), que estimulan el apetito, promueven la ganancia de peso y reducen el gasto energético (5,6). Estas interacciones de neuronas provenientes del ARC con las TRHérgicas del PVN son al parecer el mecanismo principal para el desarrollo del hipotiroidismo central asociado con el ayuno e iniciado por bajos niveles séricos de leptina; sin embargo, aún no se conocen por completo los mecanismos moleculares encargados de dicho reajuste del eje HPT a la restricción calórica; y además de las acciones directas e indirectas de la leptina sobre la expresión de TRH del PVN también están implicadas las concentraciones locales elevadas de T_3 . El resultado final de estos cambios complejos del eje HPT durante el ayuno es una respuesta adaptativa importante en mamíferos que reduce el gasto energético hasta que el alimento se encuentre nuevamente disponible.

TRH también ejerce diversos efectos dentro del sistema nervioso central (SNC) que pueden contribuir a la regulación de la homeostasis energética. Dentro de éstas, se incluye un incremento en la temperatura corporal mediada a través de neuronas del hipotálamo anterior y área preóptica que coordinan una variedad de respuestas autónomas: despertar y activación locomotora mediante mecanismos regulados por vías colinérgicas y dopaminérgicas del septum y núcleo accumbens, respectivamente (7,8), y regulación de la fase cefálica de la digestión (1). La inyección i.c.v. de TRH disminuye el apetito tanto en animales bien alimentados como en ayunados (7,9,10), sin embargo, aún se desconoce el sitio preciso en el cual TRH media estos efectos. No obstante, hay evidencia de que una población anatómicamente separada y no hipofisiotrófica de neuronas TRHérgicas parvocelulares perteneciente a la zona anterior del PVN puede estar implicada, posiblemente a través de interacciones con el sistema límbico.

IV. ANTECEDENTES

1. Funcionamiento del eje Tiroideo

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT ó HPT) efectúa la regulación del metabolismo energético y la termogénesis, controlando de manera precisa la concentración sérica de hormonas tiroideas (HT). El control del eje HPT se lleva a cabo a través de TRH (pyroGlu-His-ProNH₂) sintetizado en neuronas hipofisiotrópicas de las subdivisiones parvocelulares periventricular y medial del PVN (11-13). Estas neuronas envían sus proyecciones hacia la zona externa de la eminencia media (EM), desde donde el péptido es liberado hacia el sistema capilar porta-hipofisiario bajo un estímulo específico. Una vez secretado, TRH llega a la adenohipófisis a través de las venas portales que drenan hacia el interior de la hipófisis anterior (14).

La transmisión del mensaje de TRH se genera a través de su receptor 1 (TRH-R1) localizado en células de la adenohipófisis, induciendo la síntesis y liberación de las hormonas tirotropina (TSH) en tirotropos y de prolactina en lactotropos (15,16). A su vez, TSH estimula la síntesis y liberación de las HT, tiroxina (T₄) y 3,5,3'-triiodotironina (T₃) en la glándula tiroides (Fig. 1).

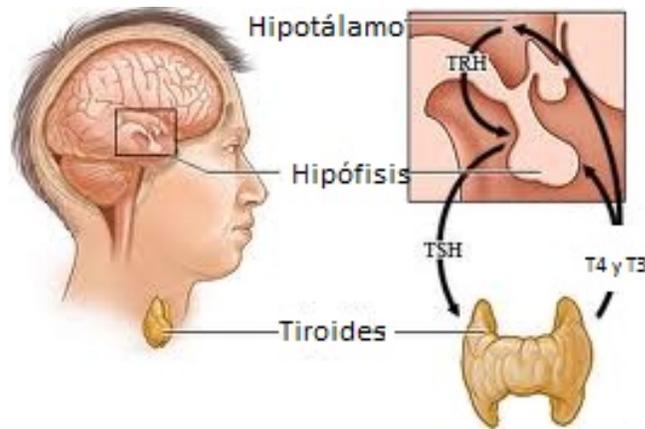


Fig. 1. Funcionamiento del eje tiroideo. TRH tiene un papel central en el mantenimiento de la homeostasis energética a través del control que ejerce sobre el eje tiroideo; éste es llevado a cabo por neuronas hipofisiotrópicas del PVN, las cuales regulan la síntesis y secreción de TSH de la adenohipófisis. La TSH viaja por circulación periférica promoviendo en la tiroides síntesis y secreción de hormonas tiroideas las cuales tienen como tejidos blanco el músculo y tejido adiposo, entre otros (1).

La T_3 , por un mecanismo clásico de retroalimentación negativa, inhibe la síntesis de TSH y de TRH en la adenohipófisis y en el PVN, respectivamente (2,17). Las HT disminuyen la unión y la síntesis del receptor R1 de TRH (18), y aumentan la síntesis y actividad de la piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) (19,20), (ectoenzima encargada de la inactivación específica de TRH) en el cerebro y en la adenohipófisis; estos eventos permiten restablecer el funcionamiento normal del eje tiroideo. En determinadas condiciones como el hipotiroidismo primario (producción tiroidea deficiente de HT), existe un incremento en la síntesis de TRH en el PVN, de TSH en adenohipófisis y disminución de la actividad y síntesis de PPII (también en adenohipófisis) (20), lo cual permite la recuperación de las concentraciones circulantes de HT.

La PPII es una peptidasa de superficie celular (anclada en la membrana plasmática) localizada en neuronas y células de la hipófisis anterior, degrada a TRH en el espacio extracelular actuando sobre su enlace piroglutamil-histidil (21,22). En la adenohipófisis esta enzima se expresa únicamente y en poca proporción en lactótrofos y somatotrofos (21,23) donde degrada a TRH que actúa como neurohormona liberado desde la EM. La regulación de la PPII adenohipofisiaria por efectores que regulan la secreción de prolactina como las HT, estrógenos y TRH (19,20,24) (25), sugiere que esta enzima puede ser un elemento adicional dentro de los mecanismos de control neuroendocrino que afectan la intensidad del estímulo hipotalámico y/o de la duración de la acción de TRH y que finalmente controlan la liberación de prolactina (23).

La regulación de la PPII es tejido específica, las HT y el 17β -estradiol incrementan o disminuyen, respectivamente, la actividad de la PPII de adenohipófisis mientras que en diversas regiones cerebrales no tienen efecto alguno (19-21). Recientemente se describió la presencia de la enzima en tanicitos que bordean la base y paredes laterales del 3er ventrículo en cerebro (26).

1.2 Papel de las hormonas tiroideas

Las HT, específicamente T_3 , regulan la transcripción de genes importantes al unirse a una familia de receptores nucleares distribuidos en el organismo; T_3 es esencial para el crecimiento celular y participa en la regulación de múltiples vías metabólicas en todos los tejidos corporales. Estas hormonas favorecen la lipólisis y glucólisis en tejido adiposo e hígado respectivamente y, modulan procesos celulares que forman parte del gasto energético basal (GEB) (27,28); aproximadamente, el 30% del GEB se debe a la acción de las hormonas tiroideas. Además, tienen efectos importantes sobre la termogénesis adaptativa, proceso caracterizado por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa del transporte de protones (cadena respiratoria) en las mitocondrias del

tejido adiposo pardo (BAT) de animales expuestos al frío. La proteína desacopladora 1 (UCP-1) evita la captura de la energía que resulta del gradiente de protones mitocondrial en forma de enlaces fosfato en el ATP, promoviendo la generación de calor. La activación de la UCP1 está bajo el control del sistema nervioso simpático y de los ácidos grasos (29), y es regulada por T_3 (30,31). Asimismo, las HT regulan el metabolismo energético a través de sus efectos centrales sobre neuronas pre-autónomas del PVN que poseen conexiones con el sistema nervioso autónomo, de manera que afectan el metabolismo hepático, controlando los niveles circulantes de glucosa (32) y potenciando la señalización β -adrenérgica (33).

Como se mencionó anteriormente, una característica común de los ejes neuroendócrinos es que poseen un sistema de regulación por retroalimentación negativa por el cual las hormonas periféricas secretadas por el órgano blanco ejercen efectos inhibitorios sobre la síntesis de su propia hormona hipofisiotrópica; esta regulación también es característica del eje HPT (12): las HT inhiben la expresión genética y el procesamiento post-traducciona l de proTRH en neuronas hipofisiotrópicas (12,34). La expresión del gen de TRH está continuamente regulado en las regiones medial y periventricular del PVN, la región promotora de este gen posee un elemento regulatorio importante denominado sitio 4, el cual está conservado en el ratón, rata y humano. Este es un sitio necesario para la unión del receptor de hormonas tiroideas (TR). La T_3 regula negativamente la expresión de prepro-TRH y estudios genéticos confirman que si bien las tres isoformas de TR (TR_{a1} , TR_{b1} y TR_{b2}) participan en la regulación negativa de la síntesis de TSH *in vivo*, es TR_{b2} la isoforma clave para la regulación negativa de los genes de TRH y de las subunidades de $TSH\alpha$ y β mediada por T_3 (35-37).

La concentración intracelular de T_3 es esencial para la regulación de la expresión de TRH y ésta se encuentra determinada por su captura en células blanco, así como por la producción y degradación de T_3 dentro del SNC. Debido a su naturaleza lipofílica, con anterioridad se pensaba que las HT podían atravesar las membranas celulares por transporte pasivo. Sin embargo, para entrar en las células blanco, las hormonas libres necesitan de un transporte activo, saturable, estereoespecífico y dependiente de ATP que está mediado principalmente por el transportador monocarboxilato 8 (MCT-8) (38,39), MCT-10 y por otras proteínas transportadoras incluyendo a un miembro de la familia de las proteínas transportadoras de aniones orgánicos independientes de Na^+ , el OATP14 (40-42) (Fig. 2).

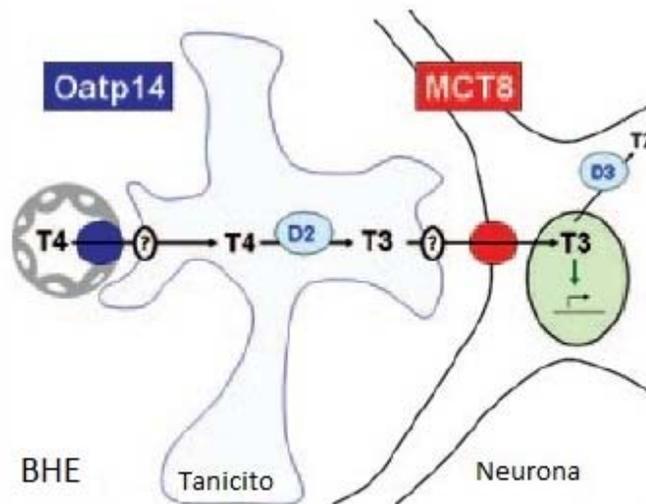


Figura 2. Modelo esquemático que muestra las rutas de transporte de las HT hacia el cerebro. El OATP14 expresado en células endoteliales transporta a la T_4 desde la sangre al fluido extracelular en el SNC. La T_4 entra en los astrocitos, por un mecanismo hasta el momento desconocido, donde es convertida a la hormona activa T_3 mediante la desyodasa tipo 2 (D2) intracelular. Después de su liberación, la T_3 es capturada por las neuronas, donde regula la expresión génica y es inactivada finalmente por la desyodasa tipo 3 (D3). Esta captura neuronal es mediada por el transportador MCT-8. BHE, barrera hematoencefálica. Modificado de Heuer *et al.*, 2005 (43).

El MCT-8 es un transportador eficiente para T_4 , T_3 y sus metabolitos inactivos rT_3 y T_2 (38), mientras que el OATP14 transporta T_4 , rT_3 y en menor grado a T_3 (44); ratones knock-out para el gen *Mct8*, muestran elevación de T_3 y bajas concentraciones séricas de T_4 (45). La captura cerebral de T_3 exógena se encuentra reducida de manera importante en ratones que no tienen un *Mct8* funcional, mientras que la captura de T_4 se reduce en un 50% comparada con ratones silvestres (46). Previamente se propuso al OATP14 como responsable de la captura de T_4 desde la circulación periférica hacia el cerebro, donde es convertida localmente a la hormona activa T_3 , la cual es transportada a las neuronas por el MCT-8 (47). Sin embargo, el mRNA y la proteína MCT-8 también se expresan, al igual que el OATP14, en microvasos sanguíneos de la barrera hematoencefálica (BHE) de ratones y ratas, de tal manera que el MCT-8 también contribuye al transporte de HT, especialmente T_4 , a través de la BHE, además de su papel en la captura de T_3 por las células neuronales (48). Recientemente se demostró por inmunoreactividad, la presencia de MCT-8 en tanicitos de la zona externa de la EM (células de origen glial que bordean el tercer ventrículo) y en terminales axónicas de neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas (49), lo cual indica que este transportador influye directamente en el mecanismo de regulación por retroalimentación negativa del eje HPT.

2. Enzimas desyodasas

La T_4 es el principal producto secretado por la glándula tiroides y funciona primordialmente como una pro-hormona para la producción de otras iodotironinas (50). De éstas, es la T_3 la que presenta mayor afinidad por los receptores nucleares a hormonas tiroideas (TR) y la que media la mayoría de los efectos metabólicos de esta clase de hormonas (51). Es por esto que los efectos biológicos de las HT dependen, en gran medida, de la conversión extratiroidea de T_4 en T_3 , catalizada por las selenodesyodasas del anillo externo (-5'), tipo 1 (D1) y tipo 2 (D2) (52); siendo la desyodasa tipo 3 (D3) una enzima de acción exclusiva sobre el anillo interno (-5) y por lo tanto inactivadora (Fig. 3).

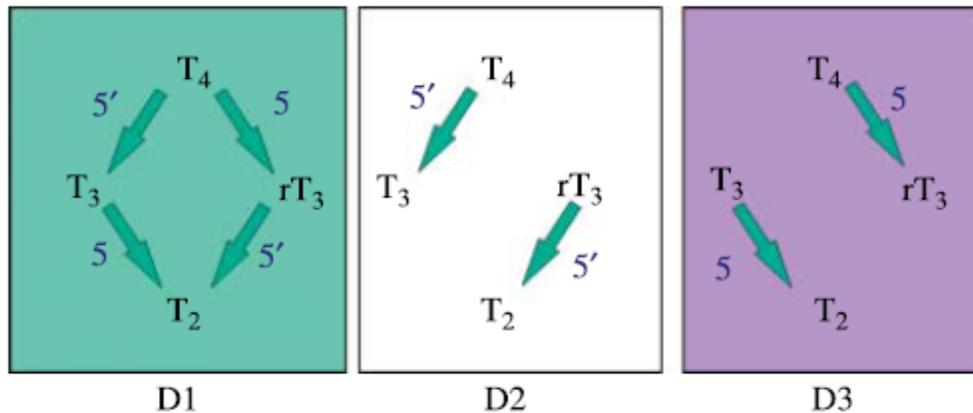


Figura 3. Reacciones de desyodación catalizadas por las isoenzimas desyodasas D1, D2 y D3 (53).

Aunque las concentraciones séricas de HT son notablemente constantes bajo condiciones fisiológicas, muchos procesos biológicos requieren de la acción rápida y limitada en el espacio de estas hormonas. Los transportadores de las HT y las desyodasas facilitan este propósito al permitir el tráfico de hormonas y aumentar la concentración local de HT a través de la conversión de T_4 a T_3 por medio de la D2, o limitar el contenido de T_3 por acción de la D3 (47,52).

2.1 Desyodasa tipo 1

Debido a que fue la primera en ser descubierta y clonada, la D1 es la desyodasa más estudiada, y por consiguiente de la que se tiene mayor conocimiento. Es una enzima que predomina en los tejidos periféricos como el hígado y el riñón y, es la principal responsable de mantener los niveles circulantes de T_3 en plasma. La D1 cataliza la desyodación de T_4 tanto del anillo externo (-5') como del interno (-5) con igual eficiencia, lo que lleva a la generación de T_3 o de la hormona inactiva T_3 reversa (rT_3). Debido a que el sustrato preferido de la D1 es la rT_3 , esta enzima también actúa en la degradación de las iodotironinas (52). D1 es sensible a la inhibición por 6-*n*-propil-2-tiouracilo (PTU), característica que la diferencia de la D2.

La D1 es una proteína integral de membrana con una extensión de 12 aminoácidos NH₂-terminal en el lumen del retículo endoplásmico y un sólo dominio transmembranal (54). La localización subcelular de la D1 madura es probablemente la membrana plasmática, aunque esto se encuentra aún en estudio. Debido a que análisis topológicos predicen que el sitio catalítico de la D1 es citosólico, una localización en la membrana plasmática podría verse, desde un punto de vista teleológico, como un acceso sencillo a la enzima para la rT₃ y T₄ circulantes, así como para facilitar la salida hacia el plasma de la T₃ producida a partir de T₄ (52). Debido a su localización subcelular la D1 tiene una contribución mínima en la cantidad de T₃ intranuclear a diferencia de la D2, que tiene una localización en la membrana del retículo endoplásmico (55,56).

Hay una diversidad de sustancias, agentes o condiciones que afectan la síntesis de D1, siendo las HT algunos de los factores más importantes. El aumento en la actividad y/o en la expresión del mRNA de D1 mediada por HT es evidente en ratas, ratones y humanos (57,58), y se debe a un aumento en la transcripción, ya que el gen *Dio 1* contiene 2 elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE). De hecho, la expresión de D1 se incrementa con el grado de hipertiroidismo en células mononucleares de humanos (59). Asimismo, TSH es capaz de aumentar los niveles del mRNA de D1 en una línea celular de tiroides de rata (60).

Existen evidencias acerca de las influencias nutricionales en la expresión de D1, el ayuno en humanos causa un aumento en la relación T₄/T₃ y en la concentración de rT₃ (61), cambios similares se han observado en pacientes con enfermedades agudas, p ej., renales, cardiovasculares, hepáticas, infecciosas o por la desnutrición asociada a éstas (62-64); esta disminución en la concentración sérica de T₃ se debe, al menos en parte, a un deterioro en la conversión de T₄ a T₃ por la D1 hepática (65).

2.2 Desyodasa tipo 2

La D2 es una desyodasa específica del anillo externo (-5'), que cataliza la conversión de T₄ a T₃, y rT₃ en 3,3'-T₂ (52), con una afinidad por T₄ que es 10³ veces mayor que la de D1; tiene una K_m para T₄ en el rango nanomolar (~2nM) y es insensible a la inactivación por PTU (fármaco utilizado para el tratamiento del hipertiroidismo ya que inhibe la conversión de T₄ en T₃) (66). rT₃ es también un sustrato excelente para la D2, aunque ligeramente menos favorecido que la T₄. Es la desyodasa responsable de la generación de T₃ dentro del SNC, hipófisis, BAT y tiroides (52,67). La presencia de actividad de D2 en músculo esquelético provee una fuente significativa de T₃ generada de manera extratiroidea (68). El proceso de generación de calor secundario a la exposición al frío, depende de la producción local de T₃ mediada por D2 del BAT (69),

aumentando la saturación de los receptores de HT de un 70 a casi el 100%, por la exposición al frío (70). Además, más del 75% de la T_3 cerebral proviene de la conversión de T_4 mediada por D2 del SNC (71).

La D2 es una proteína integral de membrana; los análisis de protección proteolítica sugieren que el extremo NH_2 - terminal permanece en el lumen del retículo endoplásmico, mientras que la porción $-COOH$ terminal se encuentra en el citosol (72), lo que permite un acceso eficaz de la T_3 generada hacia el compartimiento nuclear (73).

Las desyodasas son importantes para la acción de las HT, no sólo como fuente de T_3 plasmática sino también, especialmente en el caso de la D2, para proveer T_3 intracelular en tejidos específicos (Fig. 4). Este control de la disponibilidad de ligando que ocurre antes de su unión a TR en células blanco, es un mecanismo esencial para la regulación de la temporalidad de la respuesta celular a las HT de manera tejido específica. La importancia fisiológica de este proceso ha sido evidenciada en situaciones que pueden o no afectar las concentraciones circulantes de HT pero que alteran el comportamiento de las desyodasas en diversos tejidos (74-76).

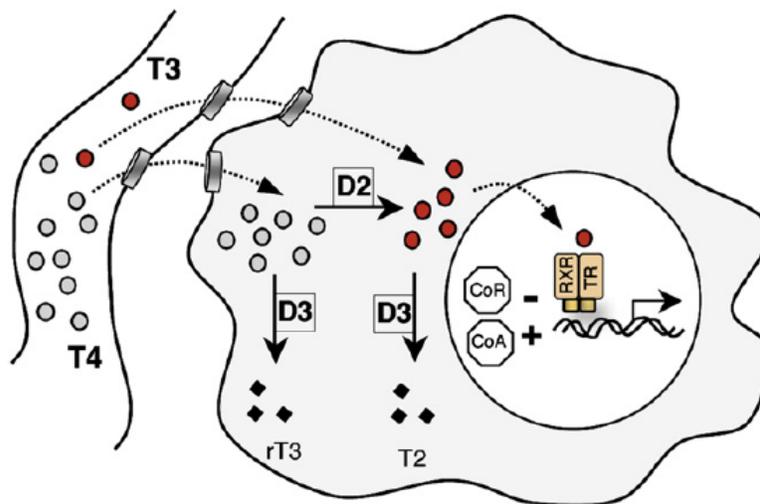


Figura 4. Esquema que ejemplifica la manera en que la acción celular de las hormonas tiroideas está regulada a diferentes niveles (77).

En el cerebro, el mRNA de la D2 se expresa en alta concentración en una región específica del hipotálamo, definida por los límites rostrales y caudales de la EM (78). Esta enzima se expresa en tanicitos, células de origen glial que residen en la base y en los bordes de las paredes infralaterales del tercer ventrículo, rodeando vasos sanguíneos en el ARC; el mRNA de D2

también está presente en la EM y el tallo hipofisiario donde la expresión de la enzima se extiende a la zona externa de la EM, adyacente a los capilares portales (Fig. 5). Los tanicitos son células endoteliales que poseen proyecciones apicales que se extienden hacia el fluido cerebro espinal (FCE) y largos procesos basales citoplasmáticos que se ramifican y dirigen hacia el hipotálamo mediobasal (EM y ARC), donde están íntimamente asociados con capilares y terminales axónicas (79,80). La gran concentración de D2 en esta región de tanicitos, rica en receptores y transportadores de hormonas tiroideas (43,81), provee de T_3 a regiones del SNC que tienen poca o nula actividad de esta desyodasa (p.ej. PVN) después de la captura de T_4 desde la circulación portal o desde el FCE.

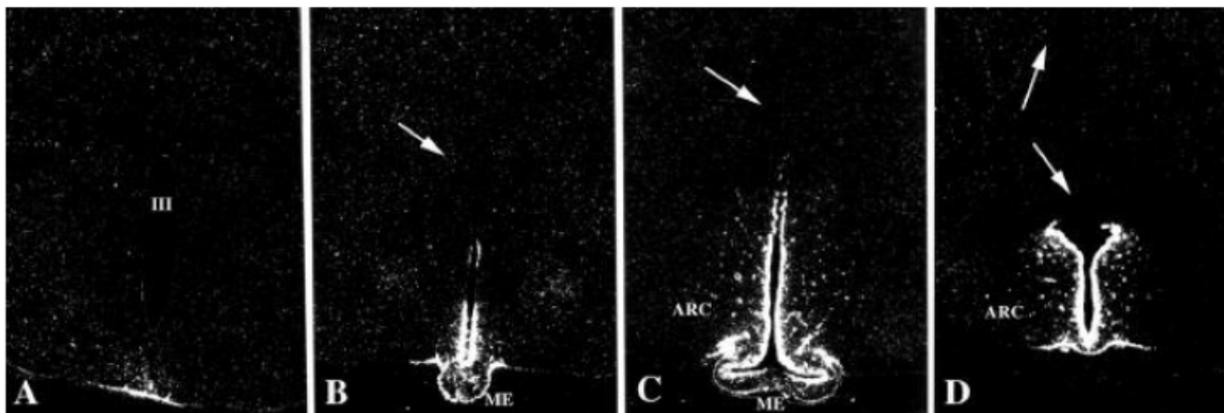


Figura 5. Distribución rostro-caudal del mRNA de la desyodasa tipo 2 en el hipotálamo medio basal (iluminación en campo oscuro). En la sección más rostral A, la hibridación se encuentra presente en la zona externa de la eminencia media. B-D, secciones más caudales con hibridación intensa en células que bordean la base y las paredes infralaterales del tercer ventrículo, en el núcleo arcuato y eminencia media. No hay señal en porciones dorsales ni en la parte más superior de las paredes del tercer ventrículo (III, flechas). Eminencia media, ME. Núcleo arcuato, ARC. Modificado de Tu *et al.*, 1997 (78).

En estados hipo o hipertiroideos, el contenido total de T_3 cerebral se altera a un grado menor comparado con lo que ocurre en otros órganos como el hígado (82). Esta estabilidad relativa de la concentración T_3 cerebral se debe al menos en parte a mecanismos autoreguladores dentro del cerebro que regulan la activación y degradación de las HT (83,84). La D2 es al parecer un factor importante en la capacidad del SNC para adaptarse a las alteraciones del estado tiroideo, el cual controla la actividad de esta enzima tanto a nivel pre como postraduccional (85-87). En ratas hipotiroideas, aumenta la expresión y actividad de D2 en corteza cerebral, al igual que el mRNA en MBH y adenohipófisis (78,88,89). El tratamiento con distintas dosis de HT (L- T_3 , L- T_4) a ratas hipotiroideas, demuestra que la T_3 disminuye el mRNA de D2 en corteza cerebral, mientras que la T_4 disminuye principalmente su actividad, lo cual indica que, *in vivo*, T_3 y T_4 ejercen efectos supresores en la actividad de D2 a través de mecanismos pre y postraducionales,

respectivamente (89). Por otro lado, la dexametasona y TRH incrementan moderadamente el mRNA de D2 en células tumorales de adenohipófisis (90). En contraste con T_3 , rT_3 reduce la actividad de D2 más no afecta los niveles de su mRNA, lo que indica que la regulación es enteramente postraducciona (90). El contenido de mRNA y la actividad de D2 también se encuentran incrementadas en varios órdenes de magnitud en áreas somatosensoriales del cerebro de ratas hipotiroideas, lo que protege de los efectos deletéreos de disponibilidad insuficiente de T_3 durante el desarrollo cerebral (91).

2.3 Desyodasa tipo 3

La D3 es una enzima esencialmente inactivadora que actúa en el anillo interno (-5) de las iodotironinas, previene la activación de T_4 e inactiva a T_3 , mediante la conversión de T_4 en rT_3 y T_3 en 3,3'- T_2 . D3 de microsomas cerebrocorticales de rata exhibe una K_m por T_3 de 6 nM y un valor más alto para T_4 (37 nM) (52).

Los productos de desyodación interna generados por la D3 son incapaces de mantener la expresión génica dependiente de HT (92). Esta enzima contribuye a la homeostasis de las HT al proteger a los tejidos de un exceso de éstas. Además de encontrarse en el SNC de la rata, también se localiza en la piel, la placenta y el útero de ratas preñadas. Como se demuestra en diversos estudios con modelos animales fetales y neonatales, la expresión de la D3 está altamente regulada de manera tejido específica, lo cual al parecer es crítico para la regulación coordinada de los efectos de las HT durante el desarrollo. La localización microsomal de la actividad de D3, similar a la de D1 y D2, indica que es también una proteína integral de membrana (93). La topología y localización subcelular de D3, aún se desconoce.

Paralelismos entre la actividad de D3 y el estado tiroideo se han encontrado en varias especies, por ejemplo en ratas: la actividad de esta enzima a través del SNC está aumentada en hipertiroidismo y disminuida en hipotiroidismo (94). Estudios usando hibridación *in situ* revelan aumentos significativos del contenido de mRNA de D3 en el SNC de ratas hipertiroideas, mientras que su expresión es casi indetectable en animales hipotiroideos (95). Sin embargo, se ignora el mecanismo por el cual se da el incremento tan dramático en el contenido de mRNA de D3 secundario al tratamiento agudo con T_3 .

El control del metabolismo de las desyodasas es multifactorial y tejido específico. Hormonas y factores de crecimiento, así como factores ambientales y nutricionales influyen sobre las tasas de síntesis y degradación de estas enzimas. De particular importancia es el efecto que tiene el estado tiroideo sobre los procesos de desyodación, lo que finalmente favorece el mantenimiento

de la homeostasis de las HT; por ejemplo, la D1 está regulada a la alta en tiroides de ratas con hipotiroidismo primario, mientras que bajo las mismas circunstancias, se presenta una disminución en la actividad de esta enzima en otros tejidos periféricos como el hígado y el riñón (96-98). En situaciones de hipotiroidismo, la actividad de la D2 aumenta en todos los tejidos, mientras que la de D3 disminuye en el cerebro (98).

En conjunto, las desyodasas son enzimas responsables del control fino de los niveles de HT y a su vez son reguladas por éstas; además, son especialmente importantes en el cerebro para el mantenimiento de los niveles de HT que se requieren para el desarrollo y función neuronal normales (99). A continuación se muestra un resumen con las características de las desyodasas (Tabla 1).

	D1	D2	D3
Reacción catalizada	5' ó 5	5'	5
Localización	Hígado, riñón, tiroides, adenohipofisis	Adenohipofisis, cerebro, BAT, tiroides, corazón, músculo esquelético	Cerebro, piel, placenta
Preferencia por sustrato	5': $rT_3 > T_4$ 5: $T_4S > T_3S$	$T_4 > rT_3$	$T_3 > T_4$
Km	$rT_3(5')$ 0.06 μ M $T_4(5')$ 2.3 μ M $T_4(5)$ 0.3 μ M	$T_4(5')$ 1 nM	$T_3(5)$ 6 nM $T_4(5)$ 37 nM
Inhibición por PTU	++++	+	+
Factores que estimulan su actividad	Hormonas tiroideas, TSH (tiroides), andrógenos (hígado)	Factores de crecimiento Catecolaminas	Hormonas tiroideas Factores de crecimiento Retinoides
Actividad durante hipotiroidismo	↓ (hígado, riñón) ↑ (tiroides)	↑ (todos los tejidos)	↓ (cerebro)

Tabla 1. Resumen de los efectos del estado tiroideo sobre la expresión y actividad de las desyodasas en diferentes tejidos. Modificado de St. Germain, 1999 (100).

3. Regulación del balance energético

Factores nutricionales y ambientales provocan cambios adaptativos en el funcionamiento del eje HPT dentro de los que se encuentran alteraciones en la secreción y metabolismo de las HT. El eje tiroideo se adapta dependiendo de las necesidades energéticas del animal, por ejemplo el balance energético negativo y el estrés asociado alteran su funcionamiento y regulación. El papel de las HT en la regulación del peso corporal es evidente en hipo e hipertiroidismo experimental o clínico. En el hipotiroidismo el peso corporal puede estar incrementado hasta un 30% y el gasto energético reducirse en un 50% relativo al de un animal eutiroideo; por el contrario, en tirotoxicosis el gasto de energía aumenta en un 50% lo que puede llevar a una disminución de peso de hasta un 15% (101,102).

El gasto energético representa la conversión de oxígeno y alimento (o grasa, glucógeno y proteína almacenada) en dióxido de carbono, agua, calor y trabajo externo. La termogénesis es el aumento en el GEB que resulta de la producción de calor en respuesta a la temperatura ambiental o la dieta. Una restricción alimentaria crónica provoca disminución del 40% de la tasa metabólica y esta adaptación ocurre tan pronto como el peso corporal disminuye a 10% del habitual (103). En contraste, la ingestión de alimentos incrementa un 25-40% la tasa metabólica y el gasto de energía en humanos y roedores (104,105).

3.1 Adaptaciones del eje HPT en respuesta al balance energético negativo

Como se mencionó anteriormente, los cambios en el balance energético alteran el mecanismo de retroalimentación negativa del eje HPT. En el ayuno de corta duración y en restricción alimentaria, se presenta un hipotiroidismo terciario (alteración a nivel hipotalámico) caracterizado por disminución de la liberación de TRH del hipotálamo (medido en la sangre porta-hipofisiaria) y de TSH (106-108); además el contenido del mRNA de TRH en esta región hipotalámica, está reducido después de 48 a 72 h de ayuno (109). La realimentación por 2 a 3 días, regresa a la normalidad los valores de T_3 y TSH (106). Esta adaptación del eje tiroideo favorece una economía de las reservas energéticas de los animales frente a la baja disponibilidad de alimento. Debido a los efectos inhibitorios de los glucocorticoides sobre el eje HPT (110), la disminución de la síntesis de TRH en ayuno en parte se debe al aumento en la concentración de corticosterona circulante observado en esta situación (107). Sin embargo, también se han propuesto a las bajas concentraciones de leptina durante ayuno o restricción alimentaria como un factor responsable de la disminución de los niveles del mRNA de pro-TRH en el PVN, ya que su inyección i.p. restaura la expresión de TRH (111) y regula positivamente la liberación adenohipofisiaria de TSH (112). Este

efecto que tiene la leptina sobre la síntesis de TRH puede ser directo, actuando a través de las neuronas TRHérgicas del PVN (113) o indirecto mediado por la inhibición de neuronas que sintetizan NPY y la activación de las que secretan POMC (114) en el ARC y que proyectan hacia el PVN.

Así, la disminución en la síntesis de TRH secundaria al ayuno, puede ser resultado de la regulación negativa llevada a cabo por diversos péptidos orexigénicos y/o por la disminución del efecto positivo de los anorexigénicos descritos; esta regulación está mediada por los receptores de AgRP (115), NPY (115,116) y α -MSH (115,117) que se expresan en neuronas TRHérgicas del PVN.

Además, durante el ayuno se activa la retroalimentación negativa por HT hacia el hipotálamo debido al incremento en la producción local de T_3 mediada por D2. Este hipertiroidismo local está también relacionado con la supresión de la síntesis y liberación de TRH en estas condiciones, efecto que no se revierte con la administración i.p. de T_4 (118). La señal que favorece el aumento de la expresión de D2 en el MBH durante el ayuno, no se origina en la glándula tiroides, sino que es resultado del cambio inverso entre las concentraciones de leptina y corticosterona circulantes (119).

El ayuno de corta duración o la diabetes, también causan una disminución en la actividad y expresión de la D1 en hígado, siendo ésta una consecuencia y no causa de la disminución de las concentraciones circulantes de T_3 en condiciones de balance energético negativo (120).

Incrementos o decrementos, incluso relativamente pequeños, en la concentración de HT están asociados con cambios paralelos en el gasto de energía (121); la disminución de la concentración sérica de HT contribuye a la disminución en la termogénesis y al mantenimiento de reservas energéticas inducidos por el ayuno. En resumen, el balance energético negativo induce una disminución de la expresión del gen de pro-TRH mediada por el incremento en la concentración local de T_3 secundaria a la elevación de la actividad de la D2 del MBH; dicha disminución del mRNA de TRH ocurre a pesar de la disminución en los niveles circulantes de HT (Fig. 6).

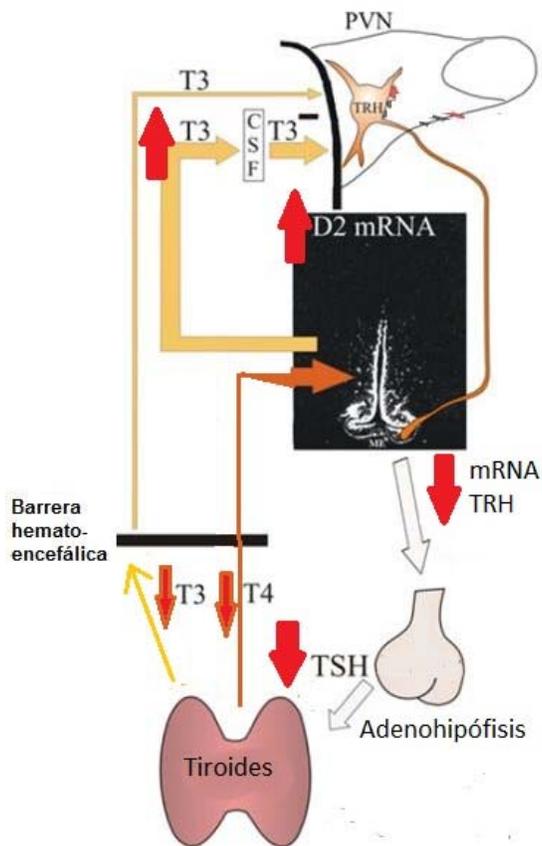


Fig. 6. Cambios en el eje HPT en ratas sometidas a restricción alimentaria. Modificado de Fekete y Lechan, 2007 (122).

Además de su papel como regulador del eje HPT, dado que los receptores de leptina y de melanocortina-4 se expresan en las neuronas TRHérgicas del PVN, TRH es también una parte importante de los sistemas de señalización que regulan el comportamiento alimentario (113,123,124).

La administración central o periférica de TRH en roedores, ya sea de manera aguda o crónica, tiene efectos anorexigénicos independientemente del consumo de agua (125-128). Los efectos agudos de TRH al parecer están mediados de manera central y son independientes de su papel en el control de la producción de HT (129).

4. Anorexia

La anorexia nervosa es un trastorno psiquiátrico que se presenta más comúnmente en mujeres durante la adolescencia en comparación con los hombres en una relación de 10:1 (130,131), se caracteriza por la manifestación de un miedo intenso a padecer obesidad; los pacientes se rehúsan a mantener un peso mínimo normal y tienen distorsión de su imagen corporal. La

incidencia de este padecimiento psiquiátrico ha aumentado alarmantemente en las últimas dos décadas (132), convirtiéndose en un problema de salud importante.

Estados mórbidos como la anorexia nervosa, provocan cambios profundos en diversos sistemas neuroendócrinos, siendo común la activación del eje adrenal (133); además, el eje HPT también sufre cambios adaptativos que son diferentes de los que ocurren a consecuencia de la restricción alimentaria (134). En términos generales, pacientes que sufren anorexia nervosa presentan bajas concentraciones séricas de T_3 probablemente debido a una menor actividad de D1 periférica como ocurre en enfermedades crónicas (135), o a una menor secreción tiroidea de T_3 en respuesta a TSH endógena (136); sin embargo las concentraciones de T_4 y TSH son normales. También muestran una respuesta retardada de la adenohipófisis para liberar TSH tras una inyección de TRH y menor respuesta de la tiroides a la estimulación por TSH (134,137-141). A las alteraciones en el eje HPT que ocurren como consecuencia de estados mórbidos subyacentes se les ha denominado síndrome de enfermedad no tiroidea, dado que su génesis no está en la glándula tiroides (53). Dicha enfermedad no tiroidea que ocurre en enfermedades como la anorexia nervosa, puede estar asociada con un incremento transitorio y leve en las concentraciones séricas de TSH, especialmente en la fase de recuperación de la enfermedad (142). El conjunto de alteraciones del eje HPT puede modular la severidad y persistencia de algunos aspectos psicológicos de la enfermedad y por lo tanto debe tomarse en consideración en el tratamiento terapéutico de este desorden de la conducta alimentaria.

Una vez que los pacientes anoréxicos empiezan a recuperar su peso se observa una mejoría en la conversión de T_4 a T_3 aunque la producción tiroidea de HT y su respuesta a TSH se mantiene reducida (136). Debido a que las alteraciones del eje HPT en pacientes anoréxicas son similares a las que ocurren en otras enfermedades no tiroideas, en las que no existe pérdida de peso, es posible que modificaciones en el funcionamiento de este eje neuroendócrino no se deban únicamente a la desnutrición asociada al balance energético negativo.

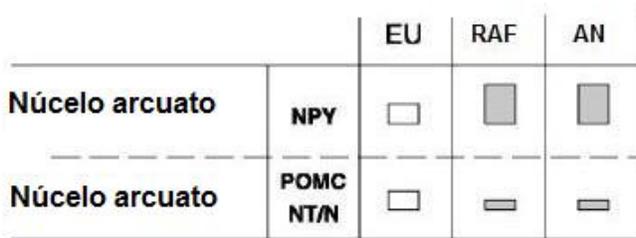
4.1 Anorexia por deshidratación

En el modelo animal de anorexia por deshidratación (AN) caracterizado por Watts *et al.*, (143), el agua de bebida se sustituye por una solución de NaCl al 2.5%. La anorexia asociada es paradójica ya que aparecen cambios en la concentración de hormonas y en la expresión de péptidos hipotalámicos similares a los que se presentan en un grupo con restricción alimentaria forzada (RAF) que consume exactamente la misma cantidad de alimento que el grupo AN. En

ambos grupos experimentales existe pérdida de peso, disminuye el contenido de leptina e insulina circulantes, incrementa el de corticosterona (143) y a nivel central los animales tienen un aumento en los niveles del mRNA de NPY y disminución de la expresión de los mRNA de POMC y neurotensina en el ARC (144); sin embargo, a pesar de tales cambios la respuesta conductual de ratas AN no es de búsqueda sino de evitación del consumo de alimentos. Comparando los cambios neuroendócrinos en ambos grupos experimentales, es posible distinguir factores que influyen en la conducta alimentaria entre los animales que buscan el alimento (RAF) y aquéllos que lo evitan (AN).

Por ejemplo, si bien no hay diferencias entre RAF y AN en la expresión de péptidos relacionados con la conducta alimentaria en el ARC hipotalámico, la expresión de CRH del hipotálamo lateral (HL) aumenta únicamente en animales AN de manera proporcional a la intensidad de la anorexia (144) (Fig. 7). Esto es relevante, dados los efectos anorexigénicos de la inyección central o directa de CRH en el HL (145).

Cambios en restricción alimentaria forzada (RAF) y anorexia (AN)



Cambios sólo en anorexia (AN)

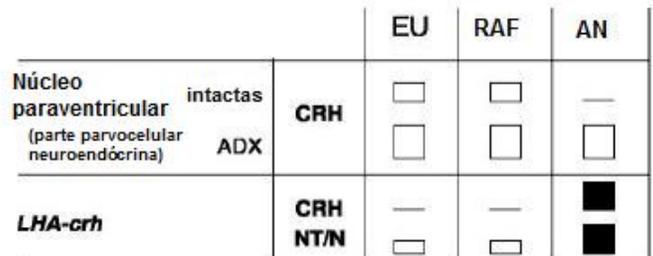


Figura 7. Diagrama esquemático que resume los cambios en la expresión génica que son exclusivos de animales deshidratados (anoréxicos [AN], *barras negras*) y aquellos que son comunes tanto en animales deshidratados como con restricción alimentaria forzada (RAF, *barras grises*) EU: control euhidratado. La altura de cada símbolo representa los niveles relativos de la expresión génica. Modificado de Watts *et al.*, 1999 (144).

En experimentos realizados previamente en nuestro laboratorio nos centramos en el estudio del eje HPT en el presente modelo. Ratas sometidas a RAF presentan, al igual que animales ayunados, disminución en la expresión del mRNA de pro-TRH en el PVN y menor concentración de TSH y HT en suero. En cambio, el grupo con AN presenta activación de las neuronas TRHérgicas del PVN (evidenciada por el aumento en la expresión del péptido en esta región, evaluado por RT-PCR) y mayor concentración sérica de TSH, a pesar de las bajas concentraciones de HT circulantes, de la importante disminución del consumo de alimentos y del peso corporal.

El contenido de TRH en la EM del grupo AN es igual al del grupo control y menor al de RAF, este hecho aunado al incremento en la concentración sérica de TSH, sugiere mayor liberación de TRH hacia la circulación portal en animales con anorexia (146). Además, la expresión de los mRNAs de la PPII y del receptor de TRH, TRH-R1, en adenohipófisis está disminuida; la expresión de la enzima inactivadora de TRH (PPII) y la de su receptor R1 responden a cambios en la concentración de TRH en cultivos de células adenohipofisiarias. A nivel de su receptor la respuesta de los lactótopos a TRH está regulada ya sea por una desensibilización rápida sin pérdida del receptor o por modulación de la cantidad de TRH-R1 presente en la membrana plasmática, por ejemplo, el número de receptores TRH-R1 disminuye después de su activación por TRH debido a internalización o inhibición de la síntesis del receptor (147). Asimismo, TRH a través de la activación de su receptor es capaz de regular a la baja la actividad de la PPII en la superficie de células adenohipofisiarias en cultivo (25). Por lo que la baja expresión de TRH-R1 y de PPII en adenohipófisis también es evidencia indirecta del aumento en la liberación de TRH a la circulación porta-hipofisiaria.

4.1.1 Respuesta al frío

La exposición al frío incrementa la concentración sérica de TSH y la expresión del gen de pro-TRH en el PVN de manera rápida y transitoria (148,149); ratas RAF expuestas a 4°C durante una hora presentan dicha adaptación del eje HPT caracterizada por el aumento en la expresión de pro-TRH en el PVN no así las ratas AN, en las cuales no existe una respuesta aditiva en los niveles previamente elevados del mRNA de TRH. Además, ya que sólo las ratas control presentan un aumento en la concentración de TSH después de la exposición a 4°C, es posible que en ambos grupos experimentales exista un retraso en la respuesta a TRH (146), como se ha observado en la falta de respuesta de TSH a TRH en pacientes con anorexia (132). Por lo que la anorexia inducida por deshidratación bloquea la respuesta de las neuronas TRHérgicas del PVN al frío.

En resumen, ratas AN presentan hipotiroidismo primario (bajo contenido de HT en suero y alto mRNA de TRH) que contrasta con el hipotiroidismo terciario de RAF (menor expresión de TRH en el PVN), aún cuando en ambos paradigmas los animales están sometidos a un balance energético negativo (146) (Fig. 8).

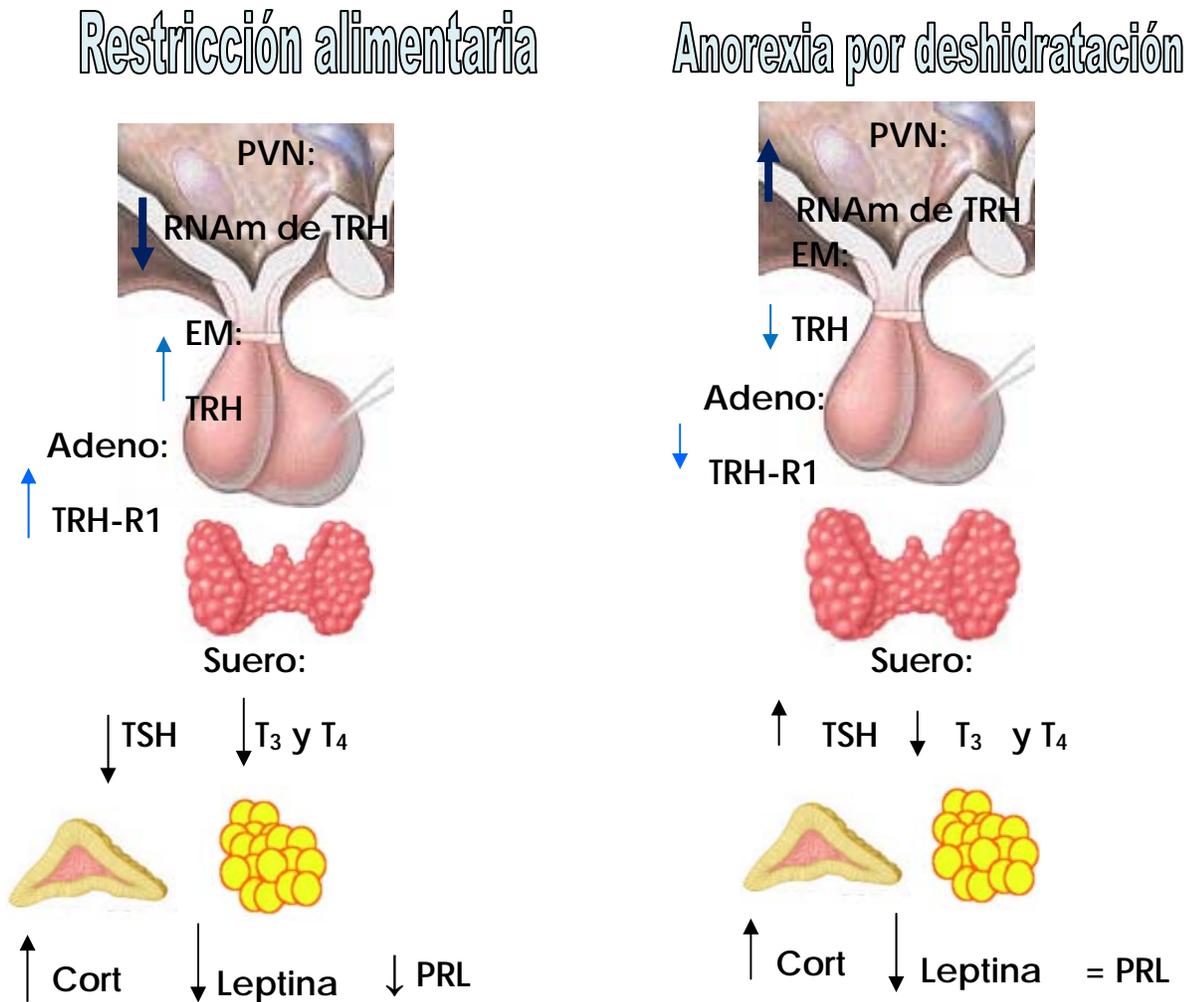


Fig. 8. Comparación de las diferencias endocrinas encontradas en nuestro laboratorio en ratas sometidas a restricción alimentaria o anorexia por deshidratación. Cort: corticosterona, PRL: prolactina (146,150).

De estos experimentos surgieron dos incógnitas principales, por un lado identificar la subpoblación de neuronas TRHérgicas activadas en el modelo de anorexia y los factores implicados en dicha activación.

Los experimentos antes mencionados fueron realizados en hembras debido a que la anorexia nerviosa es un trastorno psiquiátrico más común en mujeres (131,151); sin embargo, debido a que los estrógenos pueden interferir con el funcionamiento del eje tiroideo (152), decidimos efectuar el resto de los experimentos, incluyendo los de la presente tesis, en ratas macho.

La AVP está implicada en la respuesta homeostática a estímulos que ponen en riesgo a la vida, por ejemplo, en la conservación de agua durante periodos de deshidratación, en animales sometidos a alteraciones osmóticas como una carga de solución salina o deshidratación existe un

incremento en la expresión de AVP en la subdivisión magnocelular del PVN (153). La AVP endógena tiene un efecto tónico inhibitorio en la liberación de TSH de la hipófisis y la administración prolongada (2 a 8 días) de AVP está relacionada con aumento del peso de la tiroides, disminución transitoria de la concentración de TSH, incremento en las concentraciones circulantes de HT especialmente de T_4 y en el crecimiento de la tiroides (154). Debido a que la deshidratación a la que se somete a los animales puede ser un estímulo para la activación del sistema vasopresinérgico y por los efectos mencionados sobre el eje HPT, en el presente estudio se evaluó la concentración sérica de AVP y su expresión en el PVN.

Así, en un primer acercamiento por identificar posibles factores relacionados con el aumento en la expresión de TRH del PVN de ratas AN, en nuestro laboratorio estudiamos las implicaciones del sistema CRHérgico debido a que la expresión del mRNA de CRH del HL está aumentada en AN más no en RAF (144). Las neuronas CRHérgicas del HL envían proyecciones hacia el PVN (144) donde se expresa el receptor 2 de CRH (CRH-R2), implicado en los efectos anorexigénicos del péptido (155). Los niveles del mRNA de CRH-R2 disminuyen en ratas hembra y macho del grupo AN y aumentan levemente en ratas RAF; además, la administración de un antagonista de CRH-R2 (antisauvagina-30, ASG-30) directamente en el PVN, atenúa los efectos anorexigénicos inducidos por la deshidratación y restaura la habilidad del eje HPT de ajustarse a la situación de balance energético negativo (150), disminuyendo la concentración sérica de TSH. La activación del CRH-R2 puede entonces mediar tanto la conducta de anorexia como las alteraciones del eje HPT de ratas AN.

La habilidad de la inyección del ASG-30 de revertir algunas de las alteraciones del eje HPT, indican que probablemente neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas están activadas en el modelo, sin embargo, dado que también existe una disminución en la conducta de anorexia después de la inyección del inhibidor y dichas neuronas TRHérgicas no participan en la regulación de la conducta alimentaria de los animales, es posible que un subconjunto de neuronas TRHérgicas no hipofisiotrópicas del PVN esté implicado en la inhibición por el consumo de alimentos en ratas AN.

V. JUSTIFICACIÓN

Es evidente que el aumento en la prevalencia e incidencia de desórdenes de la conducta alimentaria, entre ellos la anorexia nervosa, los ha convertido en un problema de salud pública actual (156). Estudios comunitarios muestran que la incidencia de la anorexia nervosa es mayor en mujeres de entre 15-19 años, las cuales constituyen el 40% de la población afectada, esto resulta en una incidencia de 109.2 por 100,000 mujeres de 15-19 años por año, mientras que en hombres la incidencia fue menor de 1 por 10,000 personas-año (157-159). La prevalencia del trastorno varía de 0.6 a 4.3% dependiendo de la población estudiada y el criterio diagnóstico (160-162). En México, no hay estudios epidemiológicos concluyentes acerca de la prevalencia o incidencia de la anorexia, sin embargo entre mujeres adolescentes son comunes las conductas alimentarias de riesgo que pueden desencadenar posteriormente un trastorno de la conducta alimentaria (130,163).

En condiciones de déficit de energía, como las que presentan individuos con desnutrición calórico-proteica, los organismos presentan una disminución del gasto metabólico, lo que se logra en parte mediante una desaceleración de la actividad del eje tiroideo. El control estricto de la actividad eje HPT es esencial para la supervivencia de los animales dado que regula, entre otras funciones orgánicas, el metabolismo energético y la termogénesis adaptativa (164,165). Sin embargo, en padecimientos como la anorexia nervosa, aunque existe un balance negativo de energía, los parámetros del eje tiroideo no reflejan de manera consistente una desaceleración del mismo (menor fT_3 pero concentraciones normales o bajas de TSH, falta de respuesta de TSH a TRH (28,132,166,167), lo cual podría agravar la pérdida de peso y aumentar el riesgo de padecer otras enfermedades. Sin embargo, aún no se sabe si las alteraciones del eje HPT son causa o consecuencia de la pérdida de peso; además, es posible que alteraciones hipotalámicas puedan ser responsables de los cambios endocrinos propios de la anorexia nervosa (132).

Si bien, los acercamientos al estudio de la génesis y tratamiento de estas enfermedades utilizando modelos animales no incluyen el aspecto psicológico de los trastornos, sus aportaciones son invaluable desde el punto de vista fisiológico, formando parte de las investigaciones encaminadas a dilucidar los mecanismos neuronales que controlan, entre otros comportamientos, la conducta alimentaria.

El modelo animal de anorexia por deshidratación caracterizado por Watts *et al* (143), al incluir un grupo sometido a restricción alimentaria, permite identificar factores responsables de la inhibición del consumo de alimentos, de la falta de adaptación del eje HPT y señalar algunos con aplicación

terapéutica probable. Por otro lado, la evidencia de la participación de TRH del PVN del hipotálamo en la conducta de anorexia, sería una contribución a los estudios sobre su papel como neuromodulador.

Puesto que el eje tiroideo no se relaciona de manera directa con la regulación de la conducta alimentaria (motivación por el consumo), llama la atención el cambio diferencial en la expresión del mRNA de TRH en el PVN encontrado entre los grupos RAF y AN (146,168), por lo que el análisis de la subdivisión del PVN en donde está aumentada la expresión de TRH en animales con anorexia por deshidratación es relevante ya que permitiría conocer la naturaleza de las neuronas TRHérgicas activadas en el presente modelo.

El estudio de aquellos factores que pueden influenciar la expresión de TRH en el PVN es importante para dilucidar los mecanismos relacionados con la activación de neuronas TRHérgicas durante la anorexia y sugerir posibles acciones terapéuticas. Dentro de estos factores y debido a las implicaciones que tienen sobre el metabolismo de TRH y de las HT, es importante estudiar el papel de la D2, la PPII y el transportador MCT-8.

La ineficacia de los tratamientos farmacológicos disponibles para el tratamiento de la anorexia nervosa denota la importancia de las investigaciones encaminadas a analizar el papel que diferentes sistemas de neurotransmisores tienen en esta patología.

VI. HIPÓTESIS

A pesar del balance energético negativo, las neuronas TRHérgicas del PVN de ratas AN tienen mayor actividad biosintética por lo cual suponemos que algunas neuronas hipofisiotrópicas del PVN no responden a los mecanismos inhibitorios reportados en restricción alimentaria y son capaces de mantener el aumento de TSH y la disminución pronunciada de peso en estos animales. Además, dado que el eje tiroideo *per se* no participa en la regulación de la conducta alimentaria, es posible que un subconjunto de neuronas TRHérgicas no hipofisiotrópicas del PVN esté implicado en la conducta anoréxica de los animales. Por otro lado, las condiciones del modelo podrían afectar diferentes aspectos del sistema TRHérgico, por ejemplo, las desyodasas y el mecanismo de degradación del TRH, la PPII; lo que contribuiría a explicar la activación de las neuronas TRHérgicas del PVN y el aumento de TSH en ratas con anorexia.

VII. OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar la subdivisión del PVN que presenta activación de las neuronas TRHérgicas en el modelo de anorexia por deshidratación y el papel de las enzimas desyodasas y de la PPII en alteraciones del eje HPT en dicho modelo.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar la expresión del mRNA de pro-TRH de las subdivisiones del PVN del hipotálamo como indicador de la participación de las neuronas TRHérgicas en la conducta alimentaria diferencial entre grupos con balance negativo de energía.
2. Identificar la naturaleza hipofisiotrópica de las neuronas de TRH activadas en los grupos con anorexia vs. restricción alimentaria.
3. Determinar la participación del transportador MCT-8 en las alteraciones de la expresión de TRH en subdivisiones del PVN en el modelo animal de anorexia.
4. Identificar los cambios en la expresión y actividad de las enzimas D2 y PPII del MBH como responsables de la expresión diferencial de TRH del PVN y en la concentración sérica de TSH, respectivamente, entre grupos experimentales.
5. Describir la participación de D1 y D2 en adenohipófisis en las alteraciones de la concentración de TSH en AN.
6. Evaluar la existencia de discrepancias entre la concentración sérica de T_3 y el contenido de esta hormona en tejidos periféricos mediante alteraciones de la actividad de desyodasas.

IX. MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Ratas macho adultos (200-280g) de la cepa Wistar del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría, se mantuvieron en cajas individuales para registrar su consumo de alimento y agua, bajo condiciones controladas de 12 h de luz-oscuridad (7:00-19:00 hr) y a una temperatura de 25°C. Se permitió que los animales se adaptaran a las condiciones experimentales durante una semana antes de iniciar el experimento, durante este período tuvieron acceso ilimitado a alimento (Rodent Diet 5001 Lab Diet®; Brentwood, MO, USA) y agua; al final de esta semana fueron pesados para homogeneizar los grupos con el fin de que iniciaran el experimento con un mismo peso promedio.

Experimentos 1-4. (Para cubrir los objetivos 1, 3 y 4)

Se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Wistar, los cuales fueron divididos en los siguientes grupos:

1. Control (n=8): con acceso *ad libitum* a alimento y agua.
2. Anorexia por deshidratación (AN) (n=8): con acceso *ad libitum* a alimento y a una solución salina al 2.5% NaCl (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) como bebida (143).
3. Restricción alimentaria forzada (RAF) (n=8): con acceso *ad libitum* a agua; diariamente el alimento fue ofrecido en la misma cantidad consumida por el grupo AN el día anterior.

Diariamente se cuantificó el consumo de alimento y líquido; así como el registro de peso de los animales. Debido a que en estudios previos se reportaron cambios en la expresión de TRH en el PVN a los 7 días de experimentación, todos los experimentos tuvieron dicha duración. Los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 10:00 AM-12:00 PM.

Se colectó la sangre de cada rata para la obtención del suero. Los cerebros fueron removidos inmediatamente después de la decapitación, congelados en hielo seco y almacenados a -70 °C.

Hibridación in situ con cRNA de D2, pro-TRH y con oligos del mRNA de PPII, D3 y MCT-8

Se permitió que los cerebros congelados se aclimataran a -20°C en el criostato. Se cortaron rebanadas coronales de 14 µm y se montaron en portaobjetos Superfrost/Plus, Fisherbrand (Fisher Scientific, Pittsburgh PA). Las secciones cerebrales fueron recolectadas iniciando en el PVN y siguiendo a lo largo de la extensión del ARC, montando 3 rebanadas por lámina. Los cortes fueron almacenados a -70 °C hasta su hibridación.

Las primeras rebanadas correspondieron al PVN anterior (PVNa: -1.1 a -1.5 mm del bregma), el siguiente grupo al PVN medio (PVNm: -1.5 a -2.0 mm del bregma), las últimas rebanadas correspondieron al PVN medio caudal (PVNc: -2.0 a -2.4 mm del bregma) y al MBH (-2.0 a -3.2 mm del bregma).

Fijación de tejidos

Las láminas se secaron completamente con aire frío. Fueron sumergidas 20 min en paraformaldehído al 4% en PBS 1X a 4°C. Posteriormente sumergidas 5min en PBS 3X, 2 veces por 5 min en PBS 1X, 2 min en pronasa (24 U/ml de pronasa en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 más EDTA 5 mM), 30 seg. en glicina (2 mg/ml glicina en PBS 1X), 2 veces 30 seg. en PBS 1X; 2 min. en etanol 70% y 2 min. en etanol 100%. Las láminas se dejaron secar antes de hibridar.

Hibridación in situ (ISH) sencilla

Se utilizaron sondas de cRNA marcadas con [³⁵S]-rUTP complementarias a la región codificante completa del gen de D2 [NM_031720.3] y pro-TRH [NM_013046.2]. Para la ISH de PPII se usó una mezcla de 2 oligonucleótidos (5'GAGCAGTACGGCCAGCATGGTGACAGCCAGCAGTGCCACGATGGACACGG3' hibrida con los nucleótidos 207-256 y 5'TCAGCACCAACCAAGACCTGCGTTTGTGGGTAGAGGAAAAGCCTGCT3' dirigido contra los nucleótidos 690-739 del cDNA de la PPII de rata [NM_001108991.1]) marcados con dATP-³⁵S. Para la ISH de D3 [NM_017210.3] se utilizó una mezcla de 2 oligonucleótidos (dirigidos contra los nucleótidos 68-117 5'-AACAGCACGAGGCACGAGGCGGTCTGGGCGCAGAGCCTCAGAGAGTGAAG-3' y dirigido contra los nucleótidos 603-652 5'-GCTGACACGGTCCTCCAAGCTGCGGTGCTGTGGGATGACGTAGGGTGAAT-3') marcados con dATP-³⁵S dirigidos contra su mRNA. Todas las sondas fueron purificadas en microcolumnas G50 (GE Healthcare Life sciences, Buckinghamshire, UK). Las sondas purificadas se calentaron a 65

°C por 5 min. con tRNA de levadura, 50 μ M de DTT en agua, antes de ser diluida a una actividad de 5.0×10^7 dpm/ml con buffer de hibridación (50 % formamida, 0.25 M NaCl, solución Denhardt's 1X y dextrán sulfato al 10%). Se añadieron 60 μ l de esta mezcla a cada lámina (previamente fijadas) y se incubaron en una cámara húmeda a 42°C por toda la noche. Después de la hibridación, las láminas hibridadas con las sondas de cRNA, se lavaron 4 veces (10 min cada vez) con SSC 4X antes de la digestión con RNAsa (20 μ g/ml por 30 min A 37°C), enjuagadas a temperatura ambiente en concentraciones decrecientes de SSC que contenía DTT 1mM hasta llegar a una concentración final astringente de SSC 0.1X a 65°C por 30 min. Las láminas marcadas con oligos dATP-³⁵S, se lavaron 4 veces por 45 min con buffer de lavado (NaCl 0.6 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5) en un baño maría a 60°C.

Después de la deshidratación con concentraciones crecientes de alcohol, las láminas fueron sumergidas en una emulsión Kodak NTB-2 (Eastman Kodak, Rochester, NY) diluida 1:1 con agua destilada. Los autorradiogramas fueron revelados después de 2 (D2), 3 (TRH) ó 9 (D3, PPII) semanas de exposición a 4°C.

Hibridación *in situ* doble (ISHd)

Se realizó una ISHd para observar la colocalización de los mRNA de TRH y del transportador de HT, MCT-8, en neuronas de las diferentes subdivisiones del PVN de ratas control y AN (n=4 por grupo). El procedimiento fue similar al usado en la ISH sencilla, se usaron 3 oligos dirigidos contra el mRNA de MCT-8 [NM_147216.1] y marcados con dATP [α -³³P] (10 mCi/ml). Las secuencias de 45 oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes: 5'-GTA GCA TGG AGT AGA GGA TAC CAA CAG AGT TAT GGA TGC CGA AGA-3' hibridando con los nucleótidos de 359 al 403, 5'-GAG CAG CGT AAG AAC AAA CAT GAA GGT ACT CAG CAC CTG GAA GGT-3' hibridando con los nucleótidos de 802 al 846 y 5'-AAG TAG AAG GCC ACA TGG TAG TTA CCA AAG CAG TTT CGG AGG AGG-3' hibridando con los nucleótidos de 1419 al 1463. Las secuencias de TRH usadas fueron las siguientes: 5'-TGC CCA TGA ATA CTT GTC CTG GTT GGC ACG TCG GCC GGG GTG CTG-3' hibridando con los nucleótidos de 407 al 451, 5'-ATC AGA CTC CAT CCA GGG GAA GGA TCG CCT GCC AGG GTG CTG CCG-3' hibridando con los nucleótidos de 568 al 612; 5'-AGG GTG AAG ATC AAA GCC AGA GCC AGC AGC AAC CAA GGT CCC GGC-3' hibridando con los nucleótidos de 85 al 129, en este caso los oligonucleótidos fueron marcados con digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) conforme a lo reportado previamente (169). En la hibridación, conforme a lo reportado con anterioridad (170), se utilizaron 100 pmol de oligonucleótidos marcados por ml de cocktail de hibridación de una mezcla de las 3

distintas sondas. Después de los lavados (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5), los portaobjetos fueron sumergidos en una solución amortiguadora de 0.1M Tris-HCl pH 7.5, 1M NaCl, 1mM MgCl₂ y 0.5% BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y para la detección de las sondas marcadas con digoxigenina se incubaron toda la noche a 4°C con 1:5000 anti-Dig AP, Fab fragments (Roche Diagnostics GMBH, Mannheim). Posteriormente, para el revelado de la fosfatasa alcalina los portaobjetos se incubaron con cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT, 100 mg/ml, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim), 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP, 50 mg/ml, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim) y levamisol hidrocloreto (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Después de lavar las láminas (Tris-HCl 0.1 M pH 9.5, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM), éstas se expusieron a un film por 3 días a -80 °C. Finalmente los portaobjetos fueron emulsionados con emulsión para autorradiografía Ilford K5 (Polysciences Inc., Warrington PA) y revelados después de 6 semanas de exposición a 4 °C.

Análisis de imágenes

Los autorradiogramas de las ISH sencillas se visualizaron con un microscopio óptico Olympus BH-2 (New York Microscope Company Inc., Hicksville, NY) en condiciones de iluminación de campo claro y/o campo oscuro, utilizando una videocámara Evolution MP Media Cybernetics (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD). Las imágenes se capturaron con un objetivo 4X ó 40X y se analizaron por computadora con la ayuda del software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD). Al valor de densidad óptica integrada (OD) de la señal obtenida del PVN (TRH) o MBH (PPII y D2) se le sustrajo el valor de OD de ruido de fondo; la señal se cuantificó en 6 secciones rostro-caudales de cada animal. Para el análisis de la ISH doble (MCT-8 y TRH) las imágenes fueron capturadas con el microscopio estereológico Olympus BX51 (Olympus America Inc. NY) a una magnificación 40X, utilizando una videocámara Olympus DP71 y analizadas con el software Vsiopharm Integrator System versión 3.2.4.0 (Vsiopharm, Hoersholm, Denmark). Se cuantificaron las células positivas para el mRNA de TRH (marcadas con digoxigenina) y se cuantificó el % de colocalización con la expresión del mRNA de MCT-8 (señal radiactiva). Se analizaron 2 niveles con 3 cortes cada uno, por rata.

Experimento 5 (Para cubrir el objetivo 2)

Se utilizaron 9 ratas macho de la cepa Wistar, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones experimentales del experimento 1, se formaron los mismos grupos experimentales (C, AN y RAF, n=3). El primer día del experimento los animales recibieron una inyección i.p. de Fluorogold, marcador transportado de manera retrógrada (Fluorochrome LLC, Denver, CO), a una concentración de 15 mg/Kg de peso corporal en solución NaCl al 0.9% (2.5 ml). Debido a que la EM se encuentra fuera de la BHE, se espera que los axones que llegan a la zona externa de ésta concentren el Fluorogold que se encuentra circulando en la sangre periférica y después éste sea transportado a las células de origen (171).

Identificación de las neuronas TRHérgicas no-hipofisiotrópicas del PVN

Los cerebros de ratas inyectadas con Fluorogold fueron extraídos y rebanados en un criostato con luz tenue, se obtuvieron las subdivisiones anterior, medial y caudal del PVN como se describió anteriormente. Los oligonucleótidos utilizados fueron los complementarios a las siguientes secuencias del gen de TRH [NM_013046.2]: 105-149, 27-471, 556-603 y se marcaron con terminal deoxinucleotidiltransferasa (Roche Diagnosis GMBH, Mannheim) y digoxigenina-11-UTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) como se ha descrito previamente (169). En la hibridación, conforme a lo reportado con anterioridad (170), se utilizaron 2 pmol de oligonucleótidos marcados por ml de cocktail de hibridación de una mezcla de 3 distintas sondas. Después de los lavados, los portaobjetos fueron sumergidos en una solución amortiguadora de 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1M NaCl, 1 mM MgCl₂ y 0.5% BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) e incubados toda la noche a 4°C con anti-digoxigenina fragmentos F(ab) conjugados con rodamina (1/200; Roche Diagnostics GMBH, Mannheim). Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en la misma solución amortiguadora (sin anticuerpo), una vez en PBS 1X durante 10 min y montadas con glicerol al 50% en PBS 1X.

Análisis de imágenes

La señal de Fluorogold en los cortes cerebrales se visualizó con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Olympus America Inc. NY) a una magnificación 40X, utilizando un filtro U-MWU2 (excitación 330-385, emisión 420 nm). Las neuronas hipofisiotrópicas positivas correspondieron a aquellas células coloreadas en azul. Las neuronas TRHérgicas del PVN fueron identificadas usando un filtro U-MNG2 (excitación 530-550 nm, emisión 590 nm); las neuronas positivas se colorearon de rojo. Las imágenes se capturaron con los objetivos 10 y 40X, y analizaron por

computadora utilizando el software Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD). Los valores de OD de las células marcadas con rodamina (menos el ruido de fondo) fueron medidas en seis secciones del PVNa de cada animal; la media de los seis valores de OD se tomó como n=1 (total n=3/grupo). Cabe destacar que para el análisis se descartaron aquellas secciones del PVNa que mostraron marcaje de Fluorogold, las cuales correspondían a la interfase entre las subdivisiones anterior y medial del PVN; también se excluyó del análisis, la zona periventricular del PVNa la cual contiene algunas neuronas hipofisiotrópicas.

Experimento 6. (Para cubrir los objetivos 4, 5 y 6).

Se utilizaron 44 ratas macho de la cepa Wistar, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones del experimento 1, se formaron los mismos grupos experimentales (C [n=14], AN y RAF [n=15]).

Se colectó la sangre de cada rata para la obtención del suero y posterior medición de HT y TSH. Se extrajeron los cerebros y las adenohipófisis (AP), se almacenaron a -70°C. Se disecaron el MBH (H 8.2 a 9.8 mm; L -1.0 a 1.0 mm) y el PVN (H 7.2 a 8.2 mm; L -0.5 a 0.5 mm), con un sacabocados de 1mm de diámetro, conforme a lo reportado (146) utilizando un atlas de cerebro de rata (172). Se obtuvo el hígado, músculo y BAT para medición de la actividad de las desyodasas. En el MBH y AP se determinó la actividad enzimática de la D2 por medio del ensayo de liberación de radioyodo y con otro lote de ratas se analizó la actividad de la PPII en el MBH por el método fluométrico. En el PVN se analizó la expresión de AVP por RT-PCR.

Extracción de RNA y semicuantificación por RT-PCR

Se comparó el nivel de expresión del mRNA de AVP en el PVN de animales AN vs. RAF, inicialmente, extrayendo RNA y semi-cuantificando por RT-PCR.

Las muestras de PVN se homogeneizaron en una solución 4 M de tiocianato de guanidina (ICN, Aurora, Ohio) y se extrajo el RNA como lo reportado previamente (173). La integridad de todas las muestras se verificó por electroforesis cuantificando la relación 28S/18S. Los niveles del mRNA de AVP fueron semicuantificados por RT-PCR; ciclofilina y gliceraldehído-3P deshidrogenada (G3-PDH) fueron utilizados como controles internos de la transcripción al ser genes cuya expresión es constitutiva. El cDNA se preparó de 1.5 µg de RNA, oligo dT y oligonucleótidos específicos sintetizados en el Instituto de Biotecnología, UNAM. El número de ciclos fue optimizado para cada

oligo, utilizando 25 pmol de AVP (sentido: 5'-CACCTCTGCCTGCTACTTCC -3', antisentido: 5'-GGGCAGGTAGTTCTCCTCCT -3') y 50 pmol de ciclofilina (sentido: 5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3', antisentido: 5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC-3') y G3-PDH (sentido: 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3', antisentido: 5'-TGAAGGTCGGTGTCAACGGATTTGGC -3').

Se agregaron 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (5 U/µl). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Ultra-pure Bio-Rad, Hercules CA), teñido con bromuro de etidio (1 mg/L) y la densidad fue medida con un Fluor-S Multilmager. Las cantidades relativas del cDNA de AVP se calcularon mediante la relación con el cDNA de ciclofilina y G3-PDH.

Análisis hormonales

Radioinmunoensayo de T₃

La determinación de la concentración de T₃ en suero se realizó con un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo ¹²⁵I de fase sólida Coat-A-Count® Total T3 DPC®:TKT31, Los Angeles CA) diseñado para la determinación cuantitativa de triyodotironina total circulante. Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso.

Se marcaron cuatro tubos de polipropileno de 17x75 mm: tubos T = cuentas totales y NSB = unión no específica, por duplicado. Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 600 ng/dl utilizando 12 tubos recubiertos con anticuerpo, marcados con A (unión máxima) y con B a F (para el resto de los calibradores). Se marcaron tubos recubiertos adicionales, también en duplicado, para las muestras del suero de rata. Se agregaron, directamente en el fondo del tubo, 100 µl del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 100 µl de cada uno de los calibradores restantes y suero de las ratas en los tubos preparados para tal efecto. Se agregó 1.0 ml de I¹²⁵ T₃ Total a todos los tubos, los cuales se agitaron breve y suavemente en el vórtex. Los tubos T se reservaron aparte para su conteo. Los demás tubos (excepto los tubos T) se incubaron durante 2 horas a 37°C en baño maría. Se decantaron completamente, aspirando su contenido (excepto los tubos T). Se contaron durante 1 minuto en el contador gamma (LKB 1275 Minigamma).

Cálculo de resultados

Se obtuvieron los resultados de la curva de calibración y de las muestras en términos de concentración en pg/µl utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una

regresión logit-log de la curva de calibración. Los valores de T_3 en suero se expresan en ng/dl. El límite de detección es de 7 ng/dl; variabilidad interensayo: 10%; variabilidad intraensayo: 6%.

Radioinmunoensayo de T_4

La cuantificación de la concentración sérica de T_4 se realizó con un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo ^{125}I de fase sólida Coat-A-Count® Total T4 DPC® TKT41, Los Angeles CA) diseñado para la medición cuantitativa de la tiroxina circulante total en suero.

Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Se prepararon tubos de polipropileno de 17x75 mm: tubos T (cuentas totales) y NSB (unión no específica) por duplicado. Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 24 ng/dl utilizando 12 tubos recubiertos con anticuerpo anti- T_4 Total, marcados con A (unión máxima) y con B a F (para el resto de los calibradores). Se marcaron tubos recubiertos adicionales, también en duplicado para las muestras del suero de rata. Se pipetearon, directamente en el fondo del tubo, 25 μl del calibrador cero A en los tubos NSB y A, y 25 μl de cada uno de los calibradores restantes y suero de las ratas en los tubos preparados para tal efecto. Se agregó 1.0 ml de T_4 Total ^{125}I a todos los tubos y se mezclaron en el vórtex. Los tubos T se reservaron aparte para su conteo. Los demás tubos (excepto los tubos T) se incubaron durante 60 min. a 37 °C en baño maría. Posteriormente los tubos se decantaron completamente, aspirando su contenido (excepto los tubos T). Se contaron durante 1 minuto en el contador gamma (LKB 1275 Minigamma).

Cálculo de resultados

Se obtuvieron los resultados de la curva de calibración y de las muestras en términos de concentración en $\text{pg}/\mu\text{l}$ utilizando el software "Enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log de la curva de calibración. Los valores de T_4 en suero se expresan en $\mu\text{g}/\text{dl}$. El límite de detección es de 0.25 $\mu\text{g}/\text{dl}$; variabilidad interensayo: 10%; variabilidad intraensayo: 7%.

Radioinmunoensayo de TSH

Se utilizaron TSH de rata y anti-TSH de conejo. Se preparó la curva estándar por triplicado con 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, y 4000 pg de TSH en 200 μl de buffer RIA (50 mM, pH 7.4, BSA grado RIA al 0.25%, 150 mM de NaCl, 50 mM EDTA). Se prepararon por duplicado tubos con suero de rata control (eutiroidea) con 10, 20, 50 y 100pg de TSH en 200 μl de buffer RIA y 100 μl de anticuerpo contra TSH (dilución 1:370 000 en buffer RIA). Se incluyeron por duplicado tubos

con suero de ratas mantenidas una hora a 4°C con 10, 20, 50 y 100 pg de TSH en 200 µl de buffer RIA. En tubos de vidrio de 17 x 75 mm se colocaron por duplicado 50 µl de cada muestra y se completaron a 200 µl con buffer RIA.

A cada tubo (excepto unión específica y totales) se le agregó 100 µl de anti-TSH de conejo y 100 µl de ¹²⁵I-TSH (7000 cpm/tubo) y se mezclaron con el vórtex. Se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se agregaron 100 µl de anti-IgG de conejo, producido en cabra (dilución 1:240) y 100 µl de suero normal de conejo (dilución 1:300). Se mezclaron e incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Se agregó a cada tubo 1 ml de polietilenglicol (0.04g de PEG/ml buffer RIA) y se mezclaron con el vórtex. Se centrifugaron a 5000 cpm durante 30 min. a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y se contó el residuo en un contador gamma (LKB 1275 Minigamma).

Cálculo de resultados

Se obtuvieron los resultados de las curvas estándar o de calibración y de las muestras, en términos de concentración en pg/µl utilizando el software “Enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log de la curva estándar o de calibración. Los valores de TSH se expresan en ng/ml. El límite de detección es de 5 pg; variabilidad interensayo: 13%; variabilidad intraensayo: 6%.

ELISA de vasopresina

La AVP se determinó con un kit comercial de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzo Life Sciences, Miami FL), utilizando 100 µl de suero. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa del ensayo se encontraba recubierta con un anticuerpo de cabra específico para IgG de conejo. Se agregaron 100 µl del buffer de ensayo (solución salina de tris) a los pozos NSB y B0; se realizó una curva estándar con concentraciones de 4.1 a 1000 pg/ml y se agregaron 100 µl de ésta y de las muestras en los pozos correspondientes. Se agregaron 50 µl de la solución de fosfatasa alcalina conjugada con vasopresina (excepto al blanco y actividad total [TA]) y 50 µl del anticuerpo policlonal de conejo contra la vasopresina a todos los pozos (excepto al blanco, CT y NSB). Se selló la placa y se incubó por 24 hr a 4°C. Después de decantar el contenido de los pozos, se realizaron 3 lavados con la solución de lavado (solución salina con tris y detergentes). Se decantaron los pozos y se añadieron 5 µl de la solución de fosfatasa alcalina conjugada con vasopresina a los pozos TA. Se añadieron 200 µl del sustrato

pNpp en cada pozo y se incubó la placa por una hora a 37°C. Después de agregar 50 µl de la solución de Stop (fosfato trisódico en agua), se procedió a leer la densidad óptica de la placa a 405 nm en un lector de placas de ELISA (Biotek ELx800, Winooski VT). Los resultados se expresan en pg/ml. El límite de detección es de 3.39 pg/ml.

Análisis de actividad enzimática

Método de liberación de radioyodo para determinación de la actividad de desyodasas

Todos los ensayos se realizaron por duplicado y con un volumen final de 100-150 µl. La determinación consiste en la liberación de radioyodo del sustrato ¹²⁵I-3,3',5'-triyodo-L-tironina (actividad específica, 750-1250 µCi/µg; Perkin Elmer Life Sciences, Boston MA). Los tejidos (hígado, músculo, BAT, adenohipófisis y EM) fueron homogeneizados con un Polytron (hígado, músculo, BAT) o manualmente (adenohipófisis y EM) en amortiguador HEPES (10 mM, pH 7.5) adicionado con sacarosa (0.32 M) y EDTA (1 mM) a una concentración de 10% p/v. Se centrifugaron a 2500 rpm por 20 min. a 4°C. Los sobrenadantes se almacenaron a -70°C hasta el ensayo.

La mezcla radioactiva contiene tanto al sustrato marcado (¹²⁵I-rT₃), como al cofactor (DTT, 5 mM). Ambos se diluyeron en amortiguador HEPES (pH 7.5). En los ensayos de la actividad de D2 de adenohipófisis, se añadió PTU para inactivar a la D1. Las muestras, totales y daños (controles que revelan la cantidad de ¹²⁵I que se encuentra libre del sustrato, sin intervención enzimática) se incubaron de 1 a 3 horas a 37°C. La reacción se detuvo agregando una solución de suero normal bovino (50%) y PTU (1.0 mM). Posteriormente se adicionó ácido tricloroacético frío (TCA, 10%) para precipitar proteínas.

Las muestras problema y el daño se centrifugaron a 12,000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante es filtrado a través de columnas de intercambio catiónico (Dowex W-50X2), previamente equilibradas con ácido acético al 10%. Las muestras se eluyeron con 2 ml de ácido acético (10%); el eluido se colectó en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm y la radiación emitida se cuantificó en un contador de emisiones gamma.

El resultado proporcionado por el contador está dado en cuentas por minuto (cpm) y a partir de éstas se calculó el cociente de desyodación (CD):

$$CD = \frac{cpm_{muestra} - cpm_{daño}}{cpm_{totales}}$$

Posteriormente se calculó la actividad específica de la enzima (V), y se reportó como fmol ó pmol de ^{125}I liberado/mg proteína/tiempo de incubación:

$$V = \frac{CD \times 2 \times 1.25 \times [hormona]}{mg \text{ proteína/hora}}$$

La proteína se determinó por el método de Bradford (174).

Método fluométrico para determinación de la actividad de la PPII

Cada MBH se sonicó en 180 μ l de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4. Se tomaron 30 μ l del homogenado para determinación de proteínas por el método de Bradford (174) y 70 μ l para el ensayo fluométrico. Se preparó la siguiente mezcla de reacción por duplicado: 70 μ l del homogenado, 50 μ l de los inhibidores bacitracina y N-etilmaleimida (BAC-NEM; 1 mM cada uno), 20 μ l de dipeptidil amino peptidasa IV (DAP IV; 17 μ g/ μ l) (elimina la β -naftilamida [β NA] después de la acción degradativa de la PPII sobre el enlace piroglutamil-histidil de TRH- β NA) y 100 μ l del buffer de fosfatos. Esta mezcla se incubó en baño maría por 5 min. a 37°C, posteriormente se adicionaron 10 μ l del sustrato fluorogénico TRH- β NA (considerado como tiempo cero). De esta mezcla se tomaron 50 μ l por duplicado y se añadieron a tubos que previamente contenían 50 μ l metanol absoluto para detener la reacción enzimática, lo anterior se realizó en los tiempos 0, 90, 150 y 210 min posteriores a la adición del sustrato. Las muestras se completaron a 400 μ l con metanol al 50% a 4°C (metanol 100% + buffer de fosfatos 50 mM pH 7.4, 1:1). Se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min. a 4°C. Simultáneamente se preparó la curva estándar con un volumen de β NA (0.001 μ g/ μ l) de 0, 1.79, 3.58, 7.16, 14.32, 28.64, 57.28, 114.56, 143.20 μ l. Posteriormente se completaron estos volúmenes a 400 μ l con metanol al 50%. La lectura de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer LS 50 Luminescence Spectrometer) a una longitud de onda de emisión de 410 nm a 20 "slit" y una excitación de 335 nm a 15 "slit". La actividad de la enzima fue lineal con respecto al tiempo, se obtuvo la pendiente de cada muestra (unidades de fluorescencia vs. tiempo) y los valores se ajustaron al contenido de proteína en las membranas para obtener la actividad específica de la enzima (175).

Análisis de resultados

Se calculó la media y el error estándar de la media (ESM) para todos los datos. Se utilizó, para comparaciones entre grupos, un análisis de varianza de una o dos vías (ANOVA) y la prueba post-hoc de Fisher considerándose una diferencia significativa cuando la $p < 0.05$ (software Stat View, SAS Institute).

X. RESULTADOS

Los resultados de peso y consumo de alimentos pertenecen a un experimento representativo, ya que en todos los estudios el comportamiento de estas variables fue similar.

Consumo de alimento

Durante los 7 días de experimento, al grupo RAF se le ofreció la misma cantidad de alimento consumido por el grupo AN, alimento que ingerían inmediatamente después de que se les colocaba en su jaula. La ingestión de alimento del grupo AN disminuyó significativamente desde el día 1 del experimento, representando el 55.4 ± 3.5 % del consumo del grupo control: 100 ± 5 % (22 ± 1.1 g); su alimentación alcanzó un mínimo al día 4 (5 ± 1.6 %) y, finalmente al día 7 consumieron el 21 ± 2.8 % del consumo control: 100 ± 12 % (22 ± 2.6 g). Un ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo del tiempo, $F_{(7,1344)} = 485$, $p < 0.0001$; grupos $F_{(2,1344)} = 4143.6$, $p < 0.0001$ y una interacción entre ambas variables, $F_{(14,1344)} = 119.156$, $p < 0.0001$ (Fig. 9).

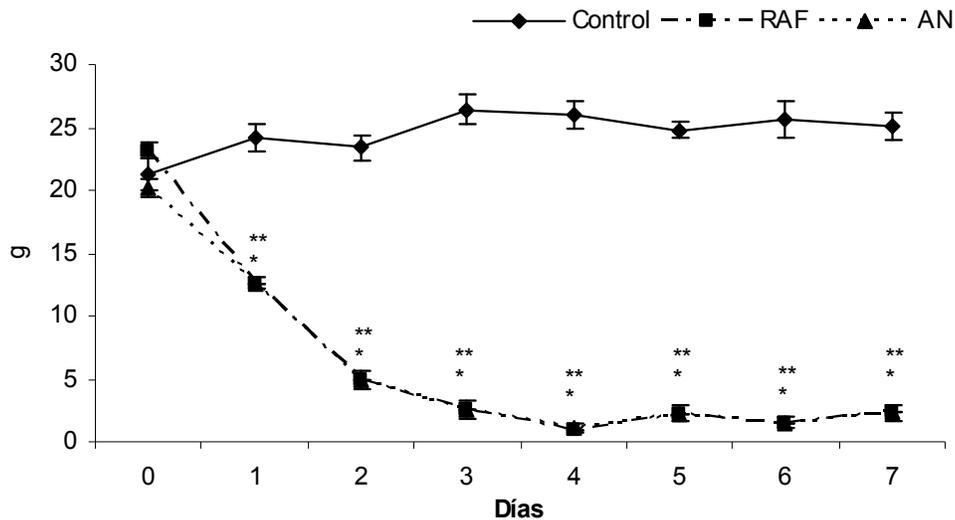


Fig. 9. Registro diario del consumo de alimento. Valores expresados en gramos (media \pm EEM). Control n=8, RAF n=8, AN n=8. Los datos fueron analizados por ANOVA de dos y una vía seguido de la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos. * $p < 0.01$ vs RAF vs C ** $p < 0.01$ AN vs C. Las tendencias de consumo de alimento de los grupos RAF y AN están superpuestas debido a que el grupo RAF fue pareado al consumo del grupo AN.

Peso

Desde el primer día del experimento, las ratas AN presentaron un peso significativamente menor vs. el grupo control ($91 \pm 1.7 \%$ vs. $100 \pm 2.6 \%$: $271.8 \pm 7.2\text{g}$). La reducción de peso del grupo RAF fue significativa vs. el control, hasta el día 2 del experimento ($89.8 \pm 1.7 \%$ vs $100 \pm 2.6 \%$: $273.8 \pm 7.2\text{g}$). A pesar de que ambos grupos experimentales consumieron la misma cantidad de alimento, el peso de las ratas AN fue menor significativamente vs. el de RAF desde el día experimental 3. Para el día 7, los grupos RAF y AN disminuyeron de peso hasta llegar a $76.4 \pm 2.3 \%$ y $62.7 \pm 1.1 \%$ respectivamente vs. C: $100 \pm 5 \%$ ($296.9 \pm 15 \text{g}$). Un ANOVA de 2 vías mostró un efecto significativo del tiempo, $F_{(7,1355)} = 94.06$, $p < 0.0001$; grupos $F_{(2,1355)} = 458.4$, $p < 0.0001$ y una interacción entre ambas variables, $F_{(14,1355)} = 24.5$, $p < 0.0001$ (Fig. 10).

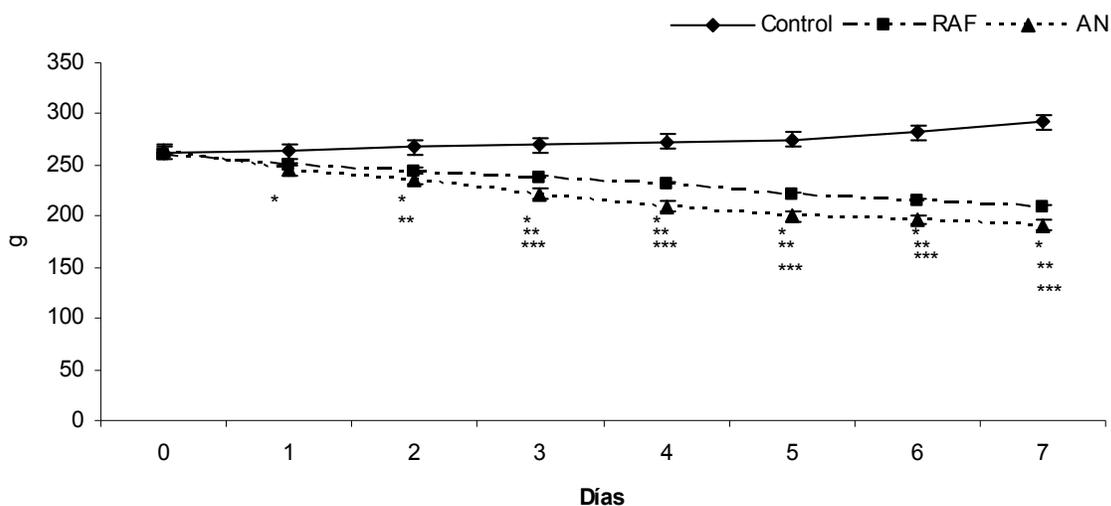


Fig. 10. Registro diario del peso corporal. Valores expresados en gramos (media±EEM). Días 0-3: Control n=12, RAF n=15, AN n=15; días 4-5 Control n=8, RAF n=10, AN n=; días 6-7 Control n=4, RAF n=5, AN n=5. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos. * $p < 0.01$ vs. RAF vs. C, ** $p < 0.01$ AN vs. C, *** $p < 0.05$ AN vs. RAF.

Eje tiroideo

Se analizaron los cambios de la concentración de TSH, T_4 y T_3 en suero de animales sacrificados al día 7 de experimentación. Conforme a lo reportado previamente (146), encontramos una disminución del 30 % ($69 \pm 8.5 \%$) en TSH de animales RAF al compararlos con el grupo control ($100 \pm 11 \%$, $1.4 \pm 0.13 \text{ ng/ml}$, t de Student $p < 0.05$); en contraste, se encontró un aumento de casi el doble en los niveles de TSH en animales AN vs. el control ($206 \pm 50 \%$).

El contenido de T_4 disminuyó en ambos grupos experimentales (RAF: $66 \pm 3 \%$ y AN: $50 \pm 5 \%$ de los valores control $100 \pm 4 \%$: $5.4 \pm 0.3 \mu\text{g/dl}$), sin embargo, la reducción fue más pronunciada en el grupo AN al compararlo con animales RAF ($F_{(2,77)} = 34$, $p < 0.0001$).

Finalmente, la concentración de T_3 se encontró reducida hasta $70 \pm 3\%$ y a $60 \pm 5 \%$ en animales RAF y AN, respectivamente, cuando se compararon con el grupo control ($100 \pm 4 \%$: $59 \pm 1.6 \text{ ng/dl}$, $F_{(2,21)} = 5.57$, $p < 0.0001$) (Fig. 11).

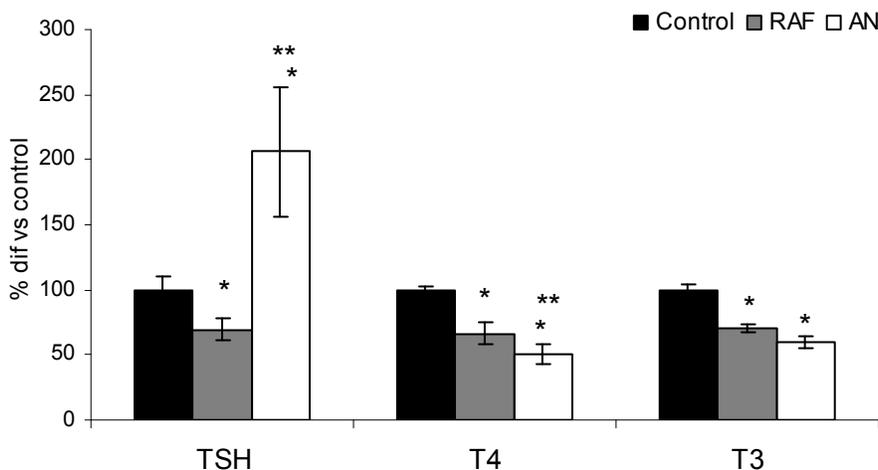


Fig. 11. Concentración sérica de TSH, T_3 y T_4 en ratas sometidas a RAF y AN. Valores expresados en % de diferencia vs. control (media \pm EEM). (Control: TSH= $2.13 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$; $T_3 = 57.27 \pm 3.9 \text{ ng/dl}$ y $T_4 = 5.94 \pm 0.4 \mu\text{g/dl}$). Control $n = 14$, RAF $n = 15$, AN $n = 15$. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Fisher para comparar diferencias entre grupos. * $p < 0.05$ vs C, ** $p < 0.05$ vs. RAF.

Actividad de desyodasas periféricas

En el tejido hepático, la actividad de D1 disminuyó a $61 \pm 9 \%$ y $71 \pm 7 \%$ en RAF y AN respectivamente, al compararlos con el grupo control ($100 \pm 9 \%$, $F_{(2,38)} = 5.8$, $p < 0.01$). La actividad 5'D en músculo incrementó en animales AN ($117 \pm 17 \%$) al compararlos con RAF, mientras que una disminución a $34 \pm 8 \%$ se observó en este grupo vs. animales control ($100 \pm 17 \%$, $F_{(2,24)} = 4.9$, $p < 0.05$). La actividad de D2 del BAT incrementó más del doble tanto en animales RAF ($214.1 \pm 39.8 \%$) como en AN ($266 \pm 54 \%$) vs. controles ($100 \pm 21 \%$, $F_{(2,33)} = 4.48$, $p < 0.05$).

La actividad de la D1 adenohipofisiaria del grupo AN incrementó al doble ($205 \pm 25 \%$) al compararla con los valores del grupo control ($100 \pm 9 \%$), en contraste, los animales RAF presentaron una disminución hasta un $44 \pm 6 \%$ vs. controles. Las diferencias resultaron también

significativas entre grupos experimentales ($F_{(2,37)} = 20.1$, $p < 0.0001$). Cambios similares se observaron en la actividad de la D2: hubo un incremento a 161 ± 23 % en animales AN y una reducción a 52 ± 6 % en el grupo RAF vs. controles. Las diferencias fueron de igual manera significativas entre grupos experimentales ($F_{(2,48)} = 10.5$, $p < 0.001$) (Tabla 2).

	Hígado	Músculo	BAT	Adenohipófisis	
	D1 (pmol ¹²⁵ I/mg proteína/h)	D2 (pmol ¹²⁵ I/mg proteína/h)	D2 (fmol ¹²⁵ I/mg proteína/h)	D1 (pmol ¹²⁵ I/mg proteína/h)	D2 (fmol ¹²⁵ I/mg proteína/h)
Control	1209 ± 106	53.1 ± 9.7	7.5 ± 1.6	549 ± 33	102.5 ± 17
RAF	742 ± 107*	18 ± 4.8*	16 ± 2.9*	193 ± 45*	53 ± 6*
AN	854 ± 88*	62 ± 9 ^{&}	20.1 ± 4*	1135 ± 136* ^{&}	165 ± 23* ^{&}

Tabla 2. Actividad de D1 en hígado y adenohipófisis, D2 en músculo, BAT y adenohipófisis. Los animales fueron sacrificados a los 7 días después de iniciado el experimento. Valores expresados como pmol¹²⁵I/mg proteína (media±EEM). Control n=14, RAF n=15, AN n=15. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de la prueba post-hoc de Fisher. *p<0.05 vs Control &p<0.05 vs RAF.

Concentración de AVP sérica y expresión en PVN

Con la finalidad de evaluar la posibilidad de que algunos de los cambios metabólicos de ratas AN se debieran a los niveles de AVP, analizamos la concentración sérica y expresión en el PVN.

La concentración sérica de AVP fue la misma entre los grupos experimentales. Valores control: 33.5 ± 9.8 ; RAF: 44 ± 3.6 y AN: 32.2 ± 5.8 pg/ml ($F_{(2,16)} = 0.911$, $p > 0.05$). La expresión en PVN aumentó en ambos grupos experimentales vs. controles (RAF: 173 ± 3 %; AN: 157 ± 3 %; control: 100 ± 2 %, $F_{(2,15)} = 616.7$, $p < 0.0001$).

Expresión del mRNA de pro-TRH en el PVN

El análisis de la expresión de pro-TRH por ISH permitió observar las subdivisiones del PVN que dan cuenta del aumento observado con anterioridad por RT-PCR. Para propósitos de análisis el PVN se subdividió en las siguientes 3 zonas conforme a lo reportado previamente (149): anterior (PVNa de bregma -1.1 a -1.5 mm), medial (PVNm de bregma -1.5 a -2.0 mm) y medio caudal (PVNc de bregma -2.0 a 2.3 mm).

Los experimentos de ISH mostraron diferencias entre grupos experimentales dependiendo de la subdivisión del PVN analizada. En el PVNa, la expresión de TRH estuvo incrementada en los animales AN aproximadamente al triple (303 ± 63 %) de los controles (100 ± 17 %, $F_{(2,14)} = 15.5$, $p < 0.01$) y también vs. el grupo RAF (95 ± 19 %). Ambos grupos experimentales presentaron una disminución en la expresión del péptido en el PVNm alcanzando un 55 ± 13 % y 41 ± 14 % en animales RAF y AN, respectivamente, vs. controles (100 ± 13 %, $F_{(2,10)} = 5$, $p < 0.05$). Finalmente en el PVNc, los niveles de mRNA de pro-TRH incrementaron en el grupo AN (159 ± 16 %) vs. controles (100 ± 18 %) y también vs. el grupo RAF (100 ± 2 %, $F_{(2,12)} = 4.5$, $p < 0.05$) (Fig. 12 y 13).

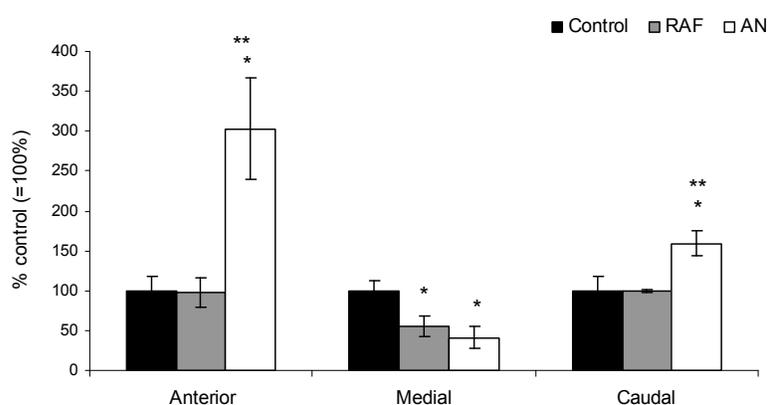


Fig. 12. Expresión del mRNA de pro-TRH en el PVN anterior, medio y caudal; determinada por hibridación *in situ*. Los animales fueron sacrificados a los 7 días después de iniciado el experimento. Valores expresados en % de diferencia en la intensidad de señal vs. los controles (=100%) (media±EEM). Control n=4, RAF n=4, AN n=4. Los datos fueron analizados un ANOVA de una vía para comparar diferencias entre grupos. * $p < 0.05$ vs C ** $p < 0.05$ vs RAF.

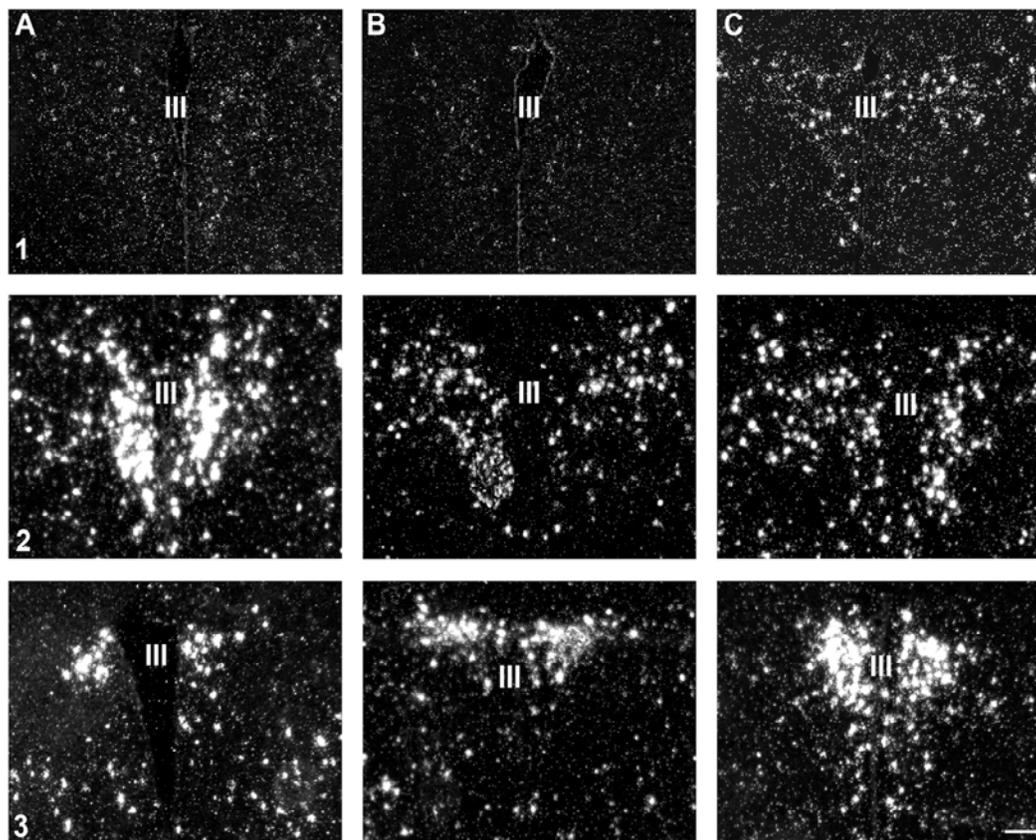


Fig. 13. Micrografías en campo oscuro de muestras representativas del mRNA de pro-TRH en PVN. Las imágenes son magnificaciones de las subdivisiones del PVN anterior (1), medial (2) y caudal (3) de animales control (A), RAF (B) y AN (C). Tercer ventrículo (III). Escala, 200 μ m.

Naturaleza de las neuronas TRHérgicas del PVN

Utilizando el marcador retrógrado Fluorogold se pudo discriminar si el origen de las neuronas de TRH en el PVNa era hipofisiotrópico. De esta manera se comparó la expresión del péptido en animales AN y con la de ratas RAF y control. La expresión de TRH, visualizada en el microscopio de fluorescencia como señal de rodamina, aumentó a un 165 ± 2 % en el PVNa de animales AN (Fig. 14C), vs. controles (100 ± 15 %, $F_{(2,6)} = 18$, $p < 0.01$) (Fig. 14A), el incremento fue también significativo al compararlo con animales RAF (92 ± 7 %, Fig. 14B). Los paneles D y E de la figura X son ampliificaciones a 40X de la señal de rodamina (Fig. 14D), y de la falta de células marcadas con Fluorogold (Fig. 14E) en el PVN de ratas con anorexia. Este resultado confirma que el aumento en la expresión de pro-TRH que exhiben las ratas con anorexia, al compararlas con ratas control o RAF, se presenta en neuronas no-hipofisiotrópicas del PVNa. Para confirmar un marcaje

exitoso de Fluorogold, se visualizó un doble marcaje con rodamina y este trazador en células TRHérgicas de las subdivisiones medial (Fig. 14F) y caudal del PVN (Fig. 14G).

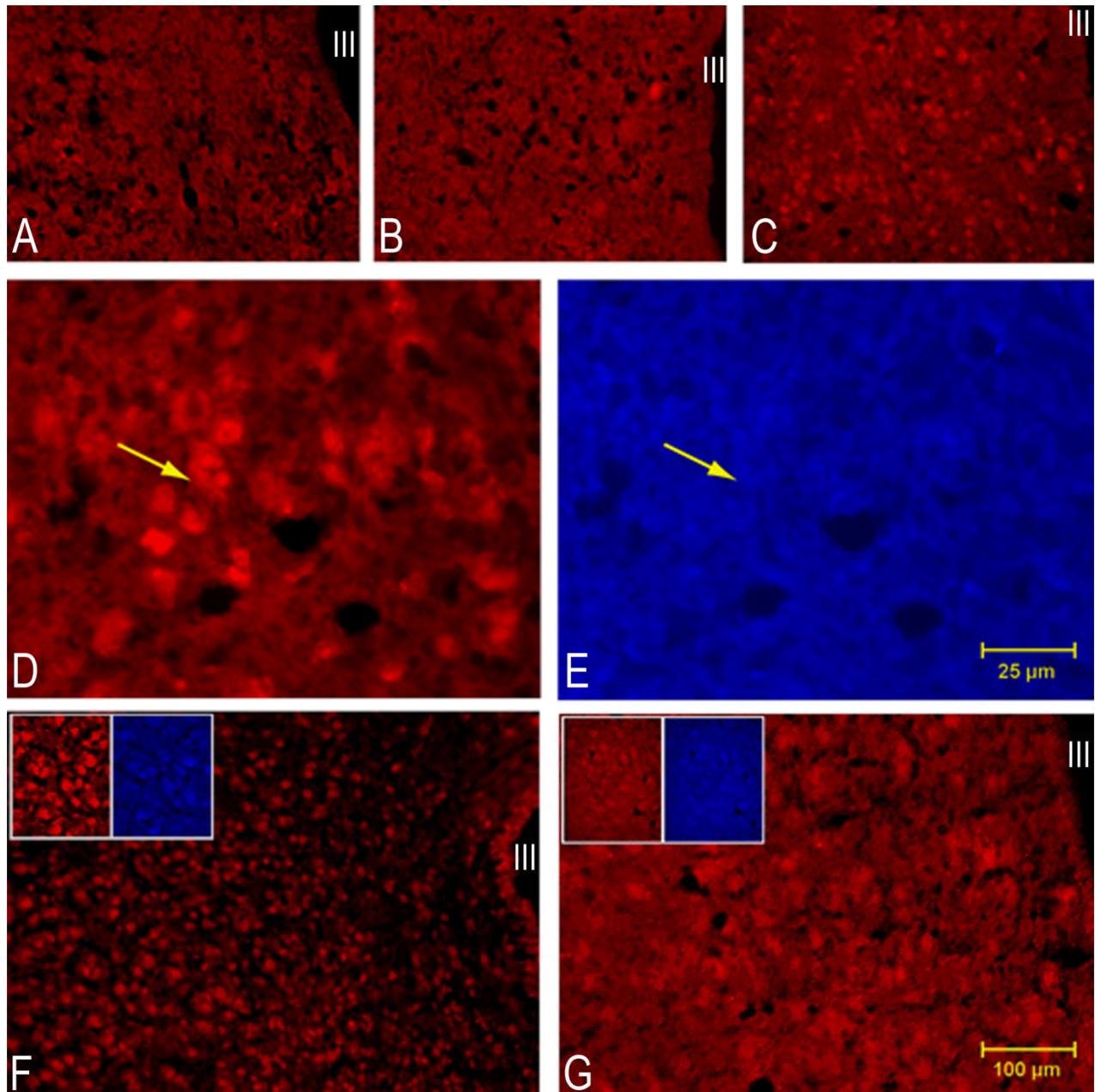


Fig. 14. Micrografías (magnificaciones a 10X) que muestran neuronas TRHérgicas marcadas con rodamina en el PVNa de animales control (A), RAF (B) y AN (C), inyectados i.p. con el trazador Fluorogold. El panel (D) muestra una magnificación 40X con el filtro rojo de células TRHérgicas marcadas con rodamina a nivel del PVNa de animales con anorexia. En el panel (E) se exhibe la misma región analizada en el panel D para denotar la falta de trazador Fluorogold. En (F) muestra una micrografía 10X de neuronas TRHérgicas marcadas con rodamina de la subdivisión medial o caudal (G) del PVN. Los insertos muestran magnificaciones a 40X de células de TRHérgicas (rojas) y aquellas marcadas con Fluorogold (azul). Tercer ventrículo (III). Escala en micrografías 10X: 100 μm y en magnificaciones 40X: 25 μm .

Colocalización de los mRNAs de MCT-8 y TRH en el PVN

El análisis de la colocalización de los mRNA's de TRH y del transportador MCT-8 en el PVN se realizó con el objetivo explicar los cambios diferenciales en la expresión de TRH de las subdivisiones medial y caudal (disminución y aumento, respectivamente) en el grupo AN.

Los mRNAs de TRH y MCT-8 colocalizaron en pocas células en los tres niveles del PVN analizados; los porcentajes de colocalización (tomando las células positivas para TRH como el 100%) fueron los siguientes: PVNa: $32.4 \pm 2.6\%$; PVNm $28.3 \pm 4.4\%$; PVNc: $24.8 \pm 5.2\%$ (Fig. 15). Las ratas AN tuvieron un menor porcentaje de colocalización de los mRNAs estudiados únicamente en la subdivisión PVNc al compararlas vs. el grupo control (13.8 ± 1.3 vs. $21.4 \pm 2.5\%$ de colocalización, $p < 0.05$) (Fig. 16).

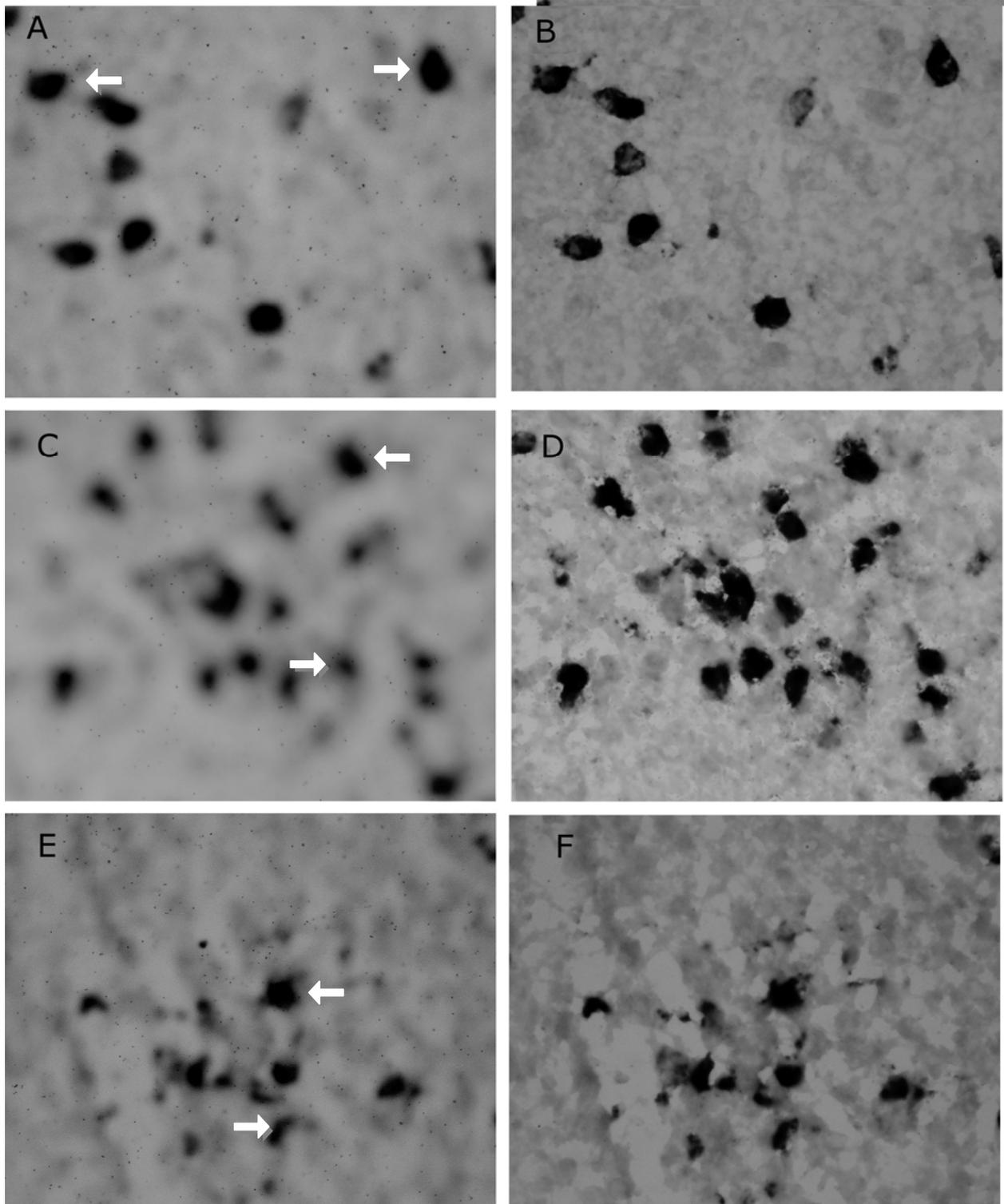


Fig.15. Microfotografías de las diferentes subdivisiones del PVN de ratas control que muestran colocalización de MCT-8 (marcado con radioactividad, P^{33}) y TRH (marcado con color, digoxigenina) por hibridación *in situ* doble. Paneles A,C y E, enfocando la señal radioactiva del mRNA de MCT-8 (precipitado de granos de plata); paneles B, D y F enfocando las células positivas para el mRNA de TRH (células negras). A,B: PVNa; C,D: PVNm; E,F: PVNc. Las flechas blancas indican células dobles (positivas para la colocalización de los mRNA's de TRH y MCT-8). Imágenes tomadas con objetivo 40X. Escala: 25 μ m.

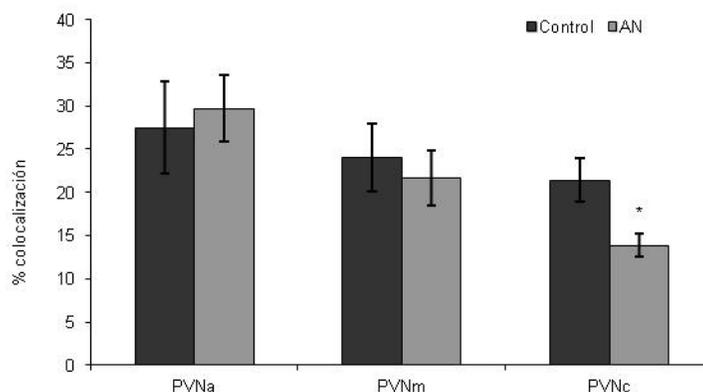


Fig. 16. Porcentaje de colocalización de los mRNA's de MCT-8 y TRH en las diferentes subdivisiones del PVN de ratas control y sometidas al modelo de anorexia por deshidratación (AN). * $p < 0.05$ vs Control de la misma región.

Actividad y expresión de D2 en el MBH

En el grupo RAF, al igual que en animales ayunados (118), aumentó la actividad de D2 en el MBH (RAF: 165 ± 12 %; C: 100 ± 11 %). En el grupo AN, la actividad de la enzima fue mayor (226 ± 29 %) a la de animales control y del grupo RAF ($F_{(2,41)} = 8.77$, $p < 0.001$) (Fig. 17A).

De la misma manera la expresión del mRNA de D2 en MBH aumentó en ambos grupos experimentales, al doble en animales RAF (262 ± 51 %) y 4 veces (402 ± 51 %) en el grupo AN vs. controles (100 ± 17 %, $F_{(2,5)} = 11.2$, $p < 0.05$) (Figs. 17B, 18).

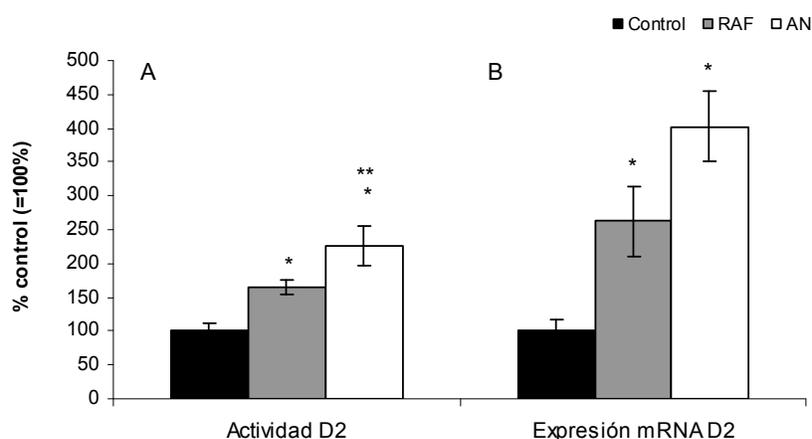


Fig. 17. A. Actividad de D2 en MBH de animales sacrificados al día 7 del experimento. Valores expresados en % de diferencia vs. control (=100%); media \pm ESM. Control n= 8; Restricción Alimentaria Forzada (RAF) n= 8; Anorexia (AN) n=8. * $p < 0.01$ vs C; ** $p < 0.01$ vs RAF. B. Cuantificación de ISH del mRNA de D2 en MBH de animales sacrificados al día 7 del experimento. Valores expresados % de diferencia vs control (=100%); media \pm ESM. Control n= 4; Restricción Alimentaria Forzada (RAF) n= 4; Anorexia (AN) n=4.

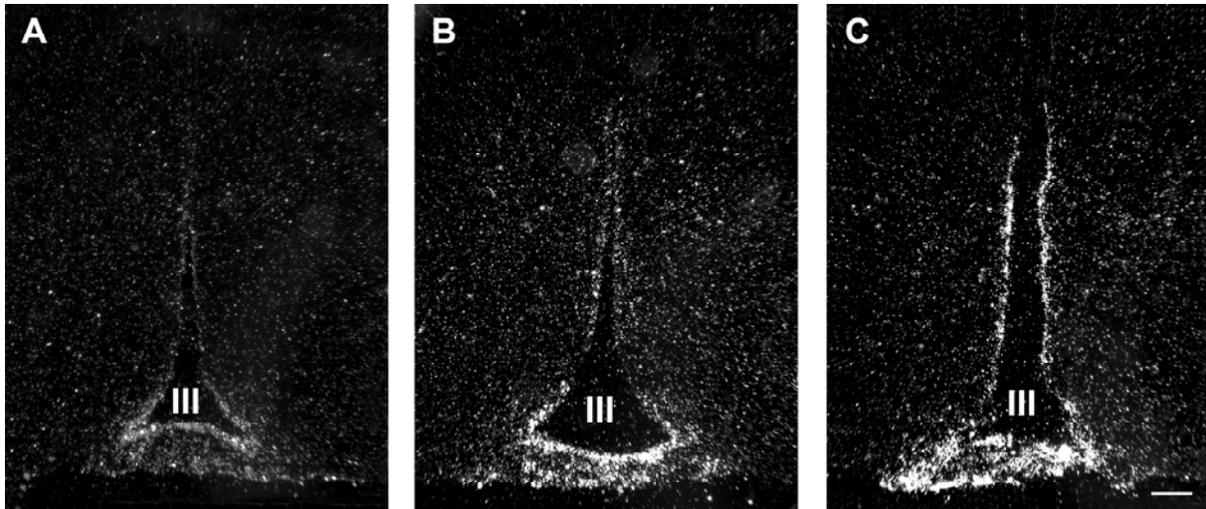


Fig. 18. Micrografías en campo oscuro de muestras representativas del mRNA de D2 en MBH. Las imágenes son magnificaciones de animales control (A), RAF (B) y AN (C). Tercer ventrículo (III). Escala, 200 μ m.

Expresión del mRNA de D3 en el PVN

La expresión del mRNA de D3 en el PVN incrementó en ambos grupos experimentales. En RAF el aumento fue de 125 % mientras que los animales AN tuvieron un incremento de 68 % al compararlos con el grupo control (1970 ± 216 ua, 100 ± 11 %). Los resultados fueron significativos utilizando la prueba *t* de Student (Fig. 19).

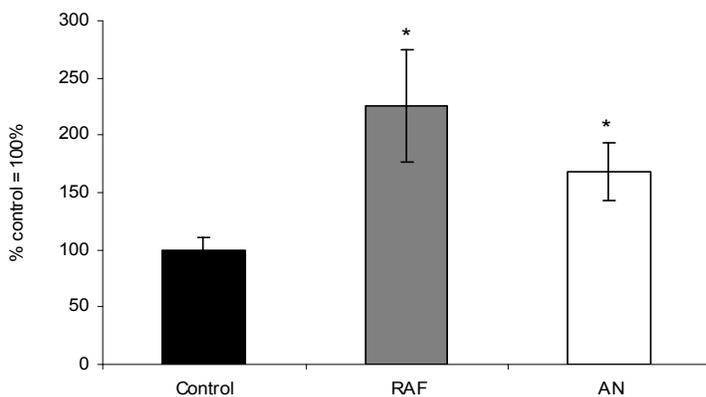


Fig. 19. Determinación de los cambios en el contenido del mRNA de D3 por ISH en el PVN de animales control, RAF y AN sacrificados después de 7 días de experimentación. Valores expresados en % de diferencia en la intensidad de señal vs. los controles (=100%) (media \pm EEM); * $p < 0.05$ vs C usando la prueba *t* de Student.

Actividad y expresión de PPII en el MBH

La actividad de PPII incrementó en el grupo AN ($136 \pm 17 \%$) vs. RAF ($82 \pm 7 \%$), mientras que este último presentó una tendencia no significativa a tener menor actividad cuando se comparó con el grupo control ($100 \pm 10 \%$). El ANOVA de una vía mostró $F_{(2,10)} = 4.4$, $p < 0.05$ (Fig. 20A).

Los cambios en la expresión del mRNA de la PPII se asemejaron a los de su actividad enzimática: el grupo RAF tuvo una disminución en la expresión de la enzima vs. el grupo control ($48 \pm 4 \%$ vs. $100 \pm 12 \%$), mientras que los animales AN mostraron un incremento en los niveles del mRNA de PPII ($130 \pm 22 \%$) vs. el grupo RAF ($F_{(2,7)} = 8.67$, $p < 0.05$) (Figs. 20B, 21).

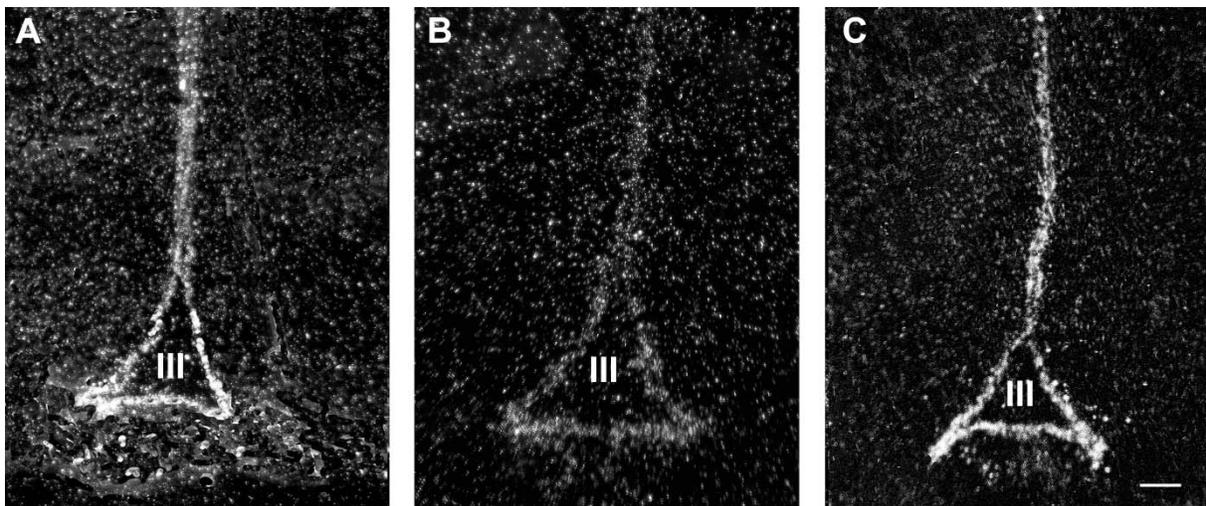
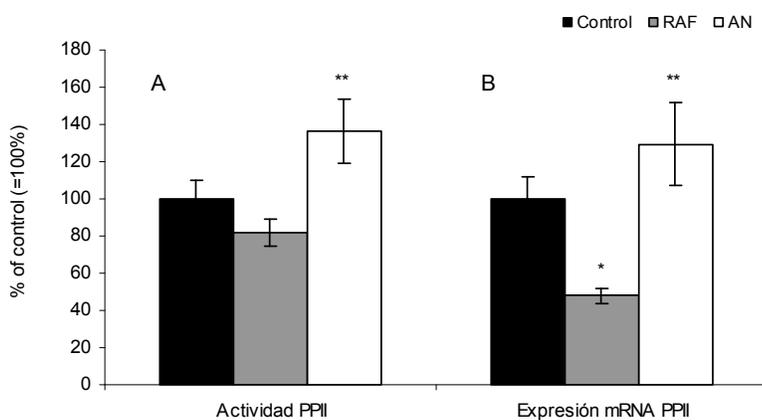


Fig. 21. Micrografías en campo oscuro de muestras representativas del mRNA de PPII en MBH. Las imágenes son magnificaciones de animales control (A), RAF (B) y AN (C). Tercer ventrículo (III). Escala, 200 μm .

Resumen de resultados

		RAF	AN
Consumo de alimentos		---	---
Peso		-	--
Eje tiroideo	TSH	--	+++
	T ₄	--	---
	T ₃	--	--
Actividad de desyodasas periféricas	D1 hígado	--	--
	D2 Músculo	--	+
	D2 BAT	++	++
	D1/D2 Adenohipófisis	--	++
AVP	Conc. sérica	SC	SC
	mRNA PVN	+	+
mRNA TRH	PVNa	SC	+++
	PVNm	--	--
	PVnc	SC	++
D2 MBH	Actividad	+	++
	mRNA	++	+++
mRNA D3 en PVN		+	+
PPII MBH	Actividad	SC	+
	mRNA	--	+

Tabla 3. Resumen de los resultados encontrados en el presente trabajo, los símbolos corresponden a niveles de magnitud relativos; (+) ó (-) aumento o disminución del parámetro analizado. Los valores sombreados en el grupo AN indican diferencias significativas entre los grupos experimentales.

XI. DISCUSIÓN

Consumo de alimento y peso corporal

La disminución de la ingestión de alimentos del grupo sometido a anorexia por deshidratación es una respuesta que en primer lugar, reduce la cantidad de agua que se requiere para la digestión, permitiendo que el agua pase del tracto gastrointestinal al resto del cuerpo y alivie algunos de los efectos de la hiperosmolemia; en segundo lugar disminuye la ingestión de osmolitos provenientes de la comida (176).

Conforme a lo descrito con anterioridad (146,168), el peso corporal de los animales con anorexia y restricción alimentaria disminuyó progresivamente desde los primeros días de experimentación, como resultado de la baja ingestión calórica. La mayor pérdida de peso observada en el grupo AN parece no deberse a una menor cantidad de tejido adiposo ya que, al menos en hembras, la disminución de tejido adiposo blanco y pardo es similar en ambos grupos experimentales (146); sin embargo, puede ser resultado de la pérdida de masa muscular o de deshidratación celular, ya que la reducción del volumen intracelular ocasiona pérdida de peso de los órganos (177,178). Por otro lado, y como se mencionará más adelante, es posible que alteraciones en la actividad de las desyodasas periféricas, específicamente en músculo, participen en la mayor pérdida de peso del grupo AN.

Eje tiroideo

Como se esperaba debido al balance energético negativo en el que se encontraban los animales, ambos grupos experimentales presentaron disminución de las concentraciones séricas de T_3 y T_4 . Asimismo, en el grupo RAF la concentración de TSH en suero fue menor vs. la del grupo control, mientras que en AN, se reprodujo el aumento en la concentración de esta hormona previamente observado (146,168). La disminución de las HT y de TSH en animales RAF, es evidencia de una respuesta adaptativa a la condición de balance energético negativo al que están sometidos los animales (107,109).

Sin embargo, a pesar de que ambos grupos se encontraban bajo un balance energético negativo, en un principio hipotetizamos que el aumento de TSH en AN podría explicarse por alteraciones en la actividad de la D2 hipofisiaria la cual se relaciona con la regulación por retroalimentación de la síntesis y liberación de TSH de tirotrópos, independientemente de la concentración sérica de T_3

(179,180), sin embargo, como se verá más adelante, la actividad adenohipofisaria de D2 en AN no parece ser responsable de los cambios de TSH. Antes bien, es posible que exista una internalización del receptor de TSH en tiroides como se observa durante el hipotiroidismo, cuando TSH está aumentada (181,182); esto está apoyado por el hecho de que pacientes con anorexia nervosa tienen menor respuesta de la glándula tiroides a TSH (136). Por otro lado, es posible que el aumento en la expresión de TRH de la subdivisión del PVNc esté manteniendo la mayor concentración de TSH en AN.

Entre las adaptaciones del eje HPT a la pérdida de peso, se encuentra la disminución en el contenido de HT que por mecanismos de retroalimentación negativa, debería provocar un aumento en TSH, sin embargo, esto no ocurre en situaciones de balance energético negativo debido a que la expresión y liberación de TRH también se encuentra disminuida. Lo que estamos observando en el presente estudio en animales con anorexia, es similar a las alteraciones del eje HPT en pacientes con hipotiroidismo subclínico, sin enfermedad tiroidea subyacente, el cual se caracteriza por concentraciones elevadas de TSH en suero (183). Dicha desregulación del eje HPT posiblemente contribuye a la falta de adaptación de los animales a la disminución del consumo de alimentos. Como se mencionó, las consecuencias de estas alteraciones, podrían incluir la internalización de los receptores de TRH y de TSH que evitarán el ajuste del eje HPT a situaciones que lo demanden; además, las concentraciones elevadas de TSH se han relacionado con diversos componentes del síndrome metabólico (184-185).

Debido a que las neuronas vasopresinérgicas del PVN están activadas durante la deshidratación (186,187), descartamos la participación de la AVP en la liberación de TSH y en las anomalías del eje tiroideo de animales AN al observar que los niveles del mRNA de esta hormona en el PVN incrementaron de manera similar que en ratas RAF; además no hubo cambios en la concentración sérica de AVP en suero de los grupos experimentales vs. el control. Nuestros resultados coinciden con los de Ciosek y Drobnik (188), quienes reportan un incremento en el contenido hipotalámico de AVP (probablemente debido a un aumento en la síntesis), pero una inhibición de la liberación del péptido desde la neurohipófisis en ratas deshidratadas al compararlas con animales eutiroides-euhidratados y vs. hipotiroides-euhidratados.

Actividad de las desyodasas periféricas

Dado que los niveles séricos de las HT no siempre reflejan el contenido local en algunos tejidos, consideramos necesario estudiar la actividad de las desyodasas periféricas (D1 y D2) después de la deshidratación y evaluar su participación en la reducción de peso del grupo AN.

Conforme a lo reportado previamente en animales sometidos a un balance energético negativo (120,189,190), la actividad de D1 disminuyó significativamente en el hígado de animales RAF y AN, siendo una consecuencia de la reducción en el contenido de HT en suero \neq que refleja un estado hipotiroideo hepático con implicaciones metabólicas en este órgano e implicadas en la homeostasis energética (120,189). El aumento en la actividad de D2 en BAT en ambos grupos experimentales, se ha propuesto como un cambio compensatorio en respuesta a la baja concentración sérica de T_3 , esto se ha observado en ratas lactantes sometidas a una dieta baja en proteínas (191,192). El aumento de la actividad de D2 en BAT también se ha reportado en ratones ayunados por 3 días, sin embargo, ya que el reemplazo con T_4 que es capaz de normalizar la concentraciones circulantes de T_3 y T_4 , no detiene el incremento de la actividad de D2, es posible que dicho aumento no está mediado en su totalidad por cambios en la concentración sérica de HT (193).

En lo que se refiere al músculo, el aumento de la actividad de D2 de ratas AN, sugirió que los niveles de T_3 eran mayores en ratas anoréxicas. La T_3 intracelular es uno de los principales reguladores de la función del músculo esquelético, por lo que la actividad de D2 es esencial para procesos como la miogénesis, regeneración muscular y modulación de la proliferación. El bloqueo de la actividad de D2 con rT_3 o mediante la ablación del gen de la enzima, conlleva a un incremento en la proliferación de células precursoras musculares (194), mientras que efectos contrarios pueden observarse con un incremento en la actividad de la D2 muscular como ocurre en el grupo AN; esto está fundamentado porque el incremento en la T_3 intracelular reduce el carcinoma de células basales y la proliferación de miocitos (194,195). La proteína clave que coordina la señalización de T_3 mediada por D2 es forkhead box O3 (FoxO3) (194); FoxOs son factores de transcripción que regulan la proliferación, metabolismo y supervivencia celulares. En músculo, específicamente, la activación de vías de FoxOs puede inducir alteraciones en la masa muscular debido a enfermedades debilitadoras; la actividad irrestricta de FoxO3 puede inducir senescencia celular, atrofia y promover un estado catabólico (196,197). Tomando en cuenta lo anterior, el incremento en la actividad de D2 muscular en ratas AN, pudo provocar atrofia muscular y reducir el peso corporal; esta observación fue consistente con la presencia de una

elevada expresión y actividad de D2 en músculo esquelético de ratones enfermos, alteraciones que no están relacionadas con una disminución del consumo de alimentos (198).

En adenohipófisis, la D2 se encarga de mantener la concentración intracelular de T_3 a partir de T_4 (52); mientras que la D1 en este tejido ayuda a mantener bajos los niveles de rT_3 , convirtiéndola en T_2 (199). Esto ayuda a potenciar la actividad de la D2, la cual es inhibida por rT_3 . Las HT afectan de manera diferencial la expresión y actividad de D1 y D2 en adenohipófisis (200). La administración exógena de T_3 provoca una rápida estimulación de la expresión y actividad de la D1 adenohipofisiaria (200). Al contrario, la expresión y actividad de D2 aumenta en condiciones de hipotiroidismo primario (67,201), disminuye por administración exógena de T_3 (151), más no cambia después de 25 días de una restricción de alimentos de 40% (202).

Los cambios en la actividad de las desyodasas en adenohipófisis dependieron del grupo experimental evaluado, cambios que se mantuvieron en ambas desyodasas. Ya que la actividad de ambas desyodasas aumentó en animales AN, es posible que el contenido local de T_3 estuviera incrementado mientras que en RAF ocurriera lo contrario, ya que la actividad de ambas enzimas disminuyó, como se ha observado, al menos para la expresión de D2, en ratas ayunadas por 24 h (203). A pesar del posible incremento en el contenido de T_3 en adenohipófisis que promueve la regulación a la baja del gen de TSH (204,205), los niveles de esta hormona en animales anoréxicos también estuvieron incrementados, lo que sugirió que alteraciones en la ocupación del receptor de T_3 pudieron ocurrir en estos animales. Una alteración similar en la ocupación del receptor de T_3 en adenohipófisis se ha propuesto para ratas sometidas a ayuno (206) y observado en el presente estudio en ratas RAF: que a pesar de la disminución en la actividad de las 5' desyodasas y como consecuencia del contenido de T_3 local, una mayor ocupación del receptor permita la supresión de la síntesis de TSH (206); en resumen, existen mecanismos en adenohipófisis que ayudan a mantener y posiblemente a aumentar la ocupación de los receptores nucleares de T_3 , permitiendo la supresión de TSH en la restricción alimentaria.

Por otro lado, estudios *in vitro* demuestran que TRH es capaz de aumentar la expresión y actividad D2 en células adenohipofisiarias (90,207), como se explicará más adelante, la expresión de TRH en el PVNc y su liberación hacia la EM estuvieron incrementadas únicamente en animales AN y por ello TRH pudo ser responsable, al menos en parte, del incremento en la actividad de D2 en adenohipófisis.

Existen diferencias en la sensibilidad de la actividad de las desyodasas tipo 1 y tipo 2 hacia PTU (179), TSH y catecolaminas (98). Debido a que la concentración sérica de TSH incrementó

únicamente en animales anoréxicos, no podemos descartar que el aumento en el contenido de esta hormona participe en la mayor actividad de D1 en adenohipófisis de este grupo, como se ha reportado para la tiroides (208,209). Además, ya que la deshidratación es una condición estresante, es probable que los animales con anorexia tuvieran mayores niveles de catecolaminas (como se observa con los glucocorticoides) lo cual pudo favorecer la activación de la D2 en adenohipófisis, como se ha observado previamente (98).

Expresión del mRNA de pro-TRH en el PVN

Previamente se había observado una disminución de la síntesis de TRH en el PVN de animales RAF (146) (por RT-PCR) al igual que ocurre durante balance energético negativo (107-109); también en RAF, existe una acumulación del péptido TRH en la EM, la cual puede interpretarse como una menor liberación hacia la circulación porta-hipofisiaria, que además quedó apoyada, en el presente estudio, por la menor concentración de TSH sérica encontrada en esos animales. En contraste, las ratas AN presentan niveles elevados del mRNA de pro-TRH en el PVN, disminución en el contenido del péptido en la EM (medido por RIA), y elevadas concentraciones de TSH en suero (146), estos datos apuntan a una mayor liberación de TRH hacia la circulación porta-hipofisiaria. Como se mencionó anteriormente, ambos grupos experimentales presentan bajos niveles de HT, pero las ratas RAF desarrollan un hipotiroidismo terciario mientras que animales AN uno primario.

Con la finalidad de obtener más información sobre el papel de TRH en la conducta alimentaria, se decidió determinar qué tipo de células TRHérgicas del PVN están activadas durante la anorexia por deshidratación. Nuestra hipótesis era que al menos una población de neuronas hipofisiotrópicas estarían contribuyendo al aumento en la expresión de TRH del PVN observada por RT-PCR, principalmente porque la inyección de un antagonista del receptor 2 de CRH (CRH-R2) en ese núcleo, revierte parcialmente el aumento en la expresión de TRH, el contenido de TSH y la disminución de los niveles de HT encontrados en animales AN (150). También hipotetizamos que si TRH además de su papel en el control del eje HPT, participa en diferentes aspectos de la alimentación, podríamos encontrar su expresión alterada entre los grupos experimentales en células no hipofisiotrópicas. Lo anterior basado en la evidencia de que neuronas TRHérgicas del PVN proyectan hacia núcleos hipotalámicos como el ARC y el ventromedial (VMH), septum lateral y el núcleo central de la amígdala, entre otras regiones, las cuales participan en la regulación de la homeostasis energética, actividad locomotora y termogénesis (210).

En efecto, la expresión de TRH del PVNa aumentó únicamente en animales con anorexia. Aunque aún se desconoce el papel preciso que tiene TRH de esta subdivisión del PVN en la conducta anoréxica, se ha definido que estas neuronas TRHérgicas no proyectan hacia la EM (13,171,211) y por tanto no son hipofisiotrópicas ni están reguladas por retroalimentación negativa por las HT circulantes (12,212). Sin embargo, tal como las neuronas de TRH hipofisiotrópicas, las neuronas TRHérgicas del PVNa están inervadas por axones que contienen péptidos reguladores de la conducta alimentaria, como NPY/AGRP y α -MSH/CART del ARC (115,213,214) y por fibras de α -MSH provenientes del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMH) (215). Además, dos de las zonas de proyección principales de las neuronas TRHérgicas del PVNa son también el ARC y el DMH (210,216); por lo que se ha sugerido que las acciones anorexigénicas de la inyección i.c.v. de TRH (7,9,10) pueden estar mediadas por esta subdivisión anterior del PVN (210).

Además de sus acciones en el metabolismo general y la termogénesis a través del control del eje HPT, TRH del PVN también tiene un papel en la termorregulación central, por lo que es probable que las neuronas TRHérgicas del PVNa, a través de sus conexiones con el área preóptica, puedan regular la termogénesis vía la activación del sistema nervioso simpático (217). Este efecto es evidente por la falta de incremento en la expresión de TRH en animales AN (debido a que ya estaba previamente aumentado), cuando se someten por una hora a 4°C (146).

Por otro lado, las neuronas de TRH del PVNa proyectan principalmente a la parte dorsomedial del ARC (210), una región que se relaciona con la regulación de la secreción de prolactina (218). TRH tiene un efecto directo sobre la secreción de esta hormona de los lactotopos adenohipofisarios (16,219) y también participa a través de sus efectos inhibitorios sobre el sistema dopaminérgico tuberoinfundibular (220). Ratas hembra sometidas al paradigma de anorexia por deshidratación (146), tienen niveles de prolactina similares a los del grupo control, pero mayores que los de animales RAF, lo cual evidencia un efecto del aumento de la expresión de TRH del PVNa observada en el presente estudio.

Nuestros resultados mostraron que los niveles del mRNA de TRH en la subdivisión del PVNm estuvieron igualmente reducidos en ambos grupos experimentales, sin embargo, en la parte caudal de la subdivisión medial (PVNc) encontramos una mayor expresión de TRH únicamente en animales AN. Existe evidencia sobre la activación diferencial de dos distintas subdivisiones de neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas en la respuesta a estímulos como la exposición frío y la lactancia, lo cual indica una subespecialización en las células hipofisiotrópicas (149). Es posible que el aumento de la liberación de TRH del MBH y la elevada concentración de TSH en suero de animales AN, se mantuviera por la activación de las neuronas hipofisiotrópicas del PVNc.

Naturaleza no hipofisiotrópica de las neuronas del PVNa activadas en anorexia

El análisis de la expresión de TRH en neuronas de animales que recibieron la inyección de Fluorogold mostró que la mayoría de las neuronas TRHérgicas del PVNa activadas en las ratas con anorexia, no son hipofisiotrópicas como ya se había reportado en ratas control (171). Esto fue evidente por el aumento en la señal de células TRHérgicas del PVNa marcadas con rodamina, que no contuvieron Fluorogold. Dadas las interconexiones del PVNa con regiones cerebrales implicadas en distintos aspectos de la conducta alimentaria mencionadas anteriormente, estos resultados indican que el péptido es un candidato plausible en la generación de la conducta de anorexia en el presente modelo.

Actividad y expresión de D2 en el MBH

Aunque los niveles séricos de T_3 disminuyeron en ambos grupos experimentales, sólo las ratas RAF presentaron el bloqueo esperado de la retroalimentación negativa del eje HPT que se observa durante el ayuno (106,108,109), lo que indicó que mecanismos centrales pudieron ser los responsables de la regulación diferencial de neuronas TRHérgicas en el PVN de animales AN.

La T_3 producida por la D2 de los tanicitos del MBH es la fuente principal de T_3 para la regulación por retroalimentación negativa de las neuronas de TRH hipofisiotrópicas (118). En un intento de entender algunos factores implicados en el aumento de la síntesis de TRH en el PVN de ratas AN, analizamos la expresión y actividad de D2 en el MBH.

Tanto la actividad como la expresión de D2 en MBH fueron mayores en los grupos experimentales vs. los del control, como se ha observado en ratas con hipotiroidismo inducido por ayuno (118); contrario a lo que esperábamos, la actividad fue aún mayor en AN vs RAF. Estos resultados apoyan el hecho de que es el cambio inverso en las concentraciones séricas de corticosterona y leptina (altas y bajas respectivamente), evidentes en animales sometidos a un balance energético negativo, las que modulan a la alta la expresión y actividad de esta enzima en el MBH (119). El aumento en la actividad de D2 en MBH es un mecanismo homeostático encaminado a mantener una elevada concentración local de T_3 que a su vez, mantiene disminuida la expresión y liberación de TRH del PVN, lo cual es evidente en el presente experimento en las neuronas TRHérgicas del PVNm de ambos grupos experimentales. La síntesis de D2 de los tanicitos del MBH, afecta directamente la expresión de péptidos reguladores de la conducta alimentaria del ARC como NPY/AgRP y POMC/CART, cuya liberación se dirige en parte, hacia el PVN y específicamente en neuronas de TRH (115-117,213). Así, la menor expresión de TRH en el PVNm, influenciada

indirectamente por la D2, resultó de una combinación de la acción de estos péptidos anorexigénicos y orexigénicos, y no fue diferente entre los grupos experimentales.

Sin embargo, la acción de la D2 no pareció tener relevancia en la expresión de TRH del PVNc, ya que independientemente del aumento en la actividad de la enzima, las ratas con AN presentaron mayor expresión de TRH que las RAF. Esto apunta a que existen diferentes subconjuntos de neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas que responden de manera distinta dependiendo del estímulo que desencadenó el balance energético negativo.

Debido a que no existieron cambios en la expresión o actividad de D2 en el MBH entre grupos experimentales, nos dimos a tarea de identificar si otros factores como la enzima inactivadora de HT, la D3, o el patrón de expresión del transportador MCT-8 pudieran influenciar el contenido a sensibilidad a la T₃ local y explicar los cambios en la expresión de TRH de AN.

Expresión del mRNA de D3 en el PVN

No existe información acerca de la expresión de D3 (enzima inactivadora de HT) en condiciones de balance energético negativo; sin embargo, a pesar de la disminución que se observa en la expresión de D3 en el SNC (incluyendo al hipotálamo), secundaria al hipertiroidismo inducido por metimazole (95), en el presente estudio, ambos grupos experimentales mostraron un incremento en el contenido de mRNA de D3 en el hipotálamo. Esto se asemeja al patrón de expresión de D2 en el MBH, el cual difiere dependiendo de la causa del hipotiroidismo, si éste es inducido por PTU o por restricción alimentaria (118). Es posible que la D3 central también respondiera de manera diferencial en el presente paradigma dado, que el hipotiroidismo se debió al déficit energético. El incremento en la expresión de D3 pudo ser parte de un mecanismo compensatorio que contrarrestaría el aumento de la actividad de D2 y recuperaría la homeostasis local de T₃; esto, ya que el contenido de T₃ en el SNC correlaciona de manera inversa con la actividad de D3 (221) y protege a los tejidos en desarrollo de concentraciones innecesariamente altas de HT (222). Sin embargo, actualmente no se conoce si el mRNA de D3 está presente en neuronas TRHérgicas ni su papel en la homeostasis central de T₃ durante la deshidratación.

Co-expresión de los mRNAs de pro-TRH y MCT-8 en el PVN

La regulación de la generación de T₃ por parte de los tanicitos que bordean las paredes del tercer ventrículo impacta en el funcionamiento de las neuronas hipofisiotrópicas (223). Debido a que los

cuerpos celulares de la mayoría de las neuronas hipofisiotrópicas se localizan a cierta distancia de los tanicitos, aún se desconoce la manera en la que la T_3 generada en estas células gliales afecta a las neuronas TRHérgicas. En el presente estudio demostramos colocalización entre los mRNAs de TRH y del transportador de HT, MCT-8, en las distintas subdivisiones PVN, con lo cual se puede inferir que la T_3 producida de manera local puede ingresar a la perikarya de las neuronas de TRH del PVN y afectar su transcripción génica. El gen que expresa TRH posee un elemento de respuesta para HT (TRE); las HT después de unirse a su receptor, forman un complejo hormona-receptor que se acopla al TRE e inhibe la expresión de TRH (35,37). El hecho de que exista una disminución en la colocalización entre ambos mRNAs en el PVNc de ratas AN comparadas con los controles, podría permitir el incremento en la expresión de TRH en esta subdivisión y sugiere una regulación de las neuronas hipofisiotrópicas dependiente del estímulo al que se somete a los animales.

Por otro lado se ha propuesto que la entrada de T_3 a las neuronas puede estar dirigida a modular las funciones de las mitocondrias, afectando la biogénesis mitocondrial y/o modulando la acción de las UCPs, con consecuencias importantes en consumo de oxígeno, generación de ATP y producción de calor (224,225). Además, la neurotransmisión se afecta por la modulación de la homeostasis energética neuronal a través de mecanismos acoplados a las mitocondrias, un proceso que es dependiente de energía (226). Así, existe importante expresión de UCP2 en procesos neuronales del sistema hipotálamo-hipofisiario, en neuronas que participan en la regulación homeostática, en las que paralelamente se observa un decremento en la respiración mitocondrial y elevada temperatura hipotalámica, comparada con regiones que no expresan UCP2 (227). Esto es relevante por el hecho de que hay una colocalización importante entre el MCT-8 y TRH en neuronas del PVNa, el cual como ya se mencionó tiene un papel importante en la regulación de la termogénesis.

Actividad y expresión de PPII en el MBH

Los animales AN y RAF presentan diferente grado de liberación de TRH, lo que puede aumentar el funcionamiento del eje HPT en AN; dado que no se ha descrito la razón para el hipotiroidismo subclínico de algunas enfermedades no tiroideas y con este modelo se presenta dicha alteración del eje, decidimos tratar de identificar si la acción de la PPII es uno de los cambios específicos en la anorexia que lleve al aumento de TSH y sus consecuencias asociadas.

Existieron cambios diferenciales en la expresión y actividad de la PPII del MBH, encontrándose aumentadas en AN y disminuidas en RAF. La elevación en la actividad de la PPII del MBH en el grupo AN pudo estar relacionada con el incremento exagerado en la actividad de D2 de esta región, y en consecuencia por el probable aumento de la concentración local de T_3 . Se sabe que la T_3 local regula a la alta la actividad de la PPII en tanicitos y promueve la degradación extracelular de TRH en la EM, reduciendo la cantidad del péptido activo que se transporta hacia el sistema porta-hipofisario y consecuentemente, la secreción de TSH (26). A pesar de que en ambos grupos experimentales se observó el aumento de la actividad de D2 en MBH, esta activación fue mayor en ratas AN, por lo que es posible que exista un umbral para la respuesta de PPII al contenido local de T_3 . La modulación de la actividad de PPII en el MBH es sensible a otras señales que llegan a esta región del cerebro y que son diferentes entre animales RAF o AN, por lo que no es posible descartar que otros factores como el aumento de somatostatina que se observa en animales anoréxicos (228) o la disminución en la concentración intrasináptica de dopamina de pacientes anoréxicos (229), sean en parte responsables de la activación de la PPII en el MBH.

TRH es otro factor importante que participa en la regulación del metabolismo de la PPII (25). La regulación diferencial de esta enzima entre animales AN y RAF, que presentan alta y baja liberación de TRH respectivamente, sugiere que la PPII puede actuar como un mecanismo homeostático del funcionamiento del eje HPT, normalizando a largo plazo los niveles de TSH y el funcionamiento del eje HPT en ratas AN; esto quedó apoyado por el hecho de que los niveles de TSH de animales con anorexia, a pesar de estar aumentados vs. controles y RAF, son inapropiadamente bajos dadas las concentraciones tan reducidas de las HT en suero. A largo plazo, estas alteraciones pueden inducir al síndrome de enfermedad no tiroidea en pacientes con anorexia (136), caracterizado por elevadas concentraciones de TSH y alteraciones del funcionamiento del eje HPT.

XII. CONCLUSIONES

Los cambios diferenciales en la expresión de TRH del PVN que se observaron entre grupos experimentales, parecen reflejar una adaptación distinta del eje HPT y del sistema TRHérgico central no hipofisiotrópico a las condiciones de balance energético negativo, y son un acercamiento importante para entender la organización de las redes neurales que controlan el comportamiento alimentario.

Si bien las enzimas desyodasas eran posibles candidatas responsables de las alteraciones del eje HPT en ratas AN, la actividad D2 del MBH se encontró elevada en ambos grupos experimentales lo cual tuvo una relación negativa sólo con la disminución en la expresión de TRH del PVNm, pero no pareció ser responsable de los cambios diferenciales en otras subdivisiones del PVN.

En el presente estudio, proporcionamos evidencia de la activación de neuronas TRHérgicas no hipofisiotrópicas del PVNa de animales anoréxicos, que pudieron ser en parte responsables de la inhibición del consumo de alimentos de estos animales. Mostramos datos que apuntan a una subespecialización de neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas que responden de manera diferencial dependiendo del estímulo que causó el balance energético negativo.

Una implicación de nuestros resultados en la anorexia nervosa, es la posibilidad de que los pacientes con este padecimiento, tengan incremento en la síntesis de TRH en un subconjunto de células hipofisiotrópicas que en fases tempranas de la enfermedad, mantenga una elevación de la liberación del péptido desde el MBH, provocando a largo plazo, una desensibilización de los receptores de TRH en la adenohipófisis (como la regulación negativa del receptor TRH-R1 que se ha descrito en AN) (146). Esto es relevante ya que una de las alteraciones más comunes del eje HPT que se presenta en pacientes anoréxicos es un retraso en la respuesta de TSH de la adenohipófisis a la administración exógena de TRH (230,231).

Tomando en cuenta nuestros resultados, es posible que en humanos durante el desarrollo de la anorexia se activen a largo plazo mecanismos contrarreguladores encaminados a restaurar la homeostasis del eje HPT tales como la elevación en la actividad de la enzima que degrada a TRH en el MBH, lo que ayudaría a explicar los niveles normales o altos de TSH en pacientes con anorexia (232).

En resumen, las neuronas TRHérgicas del PVN responden de manera diferencial en las 2 condiciones de balance energético negativo estudiadas, lo cual repercute en la modulación de la

homeostasis energética de manera específica en ratas RAF y AN. Esto evidencia que hay otras señales que sobrepasan a la respuesta normal secundaria a alteraciones del balance energético lo cual requiere de mayor estudio.

Como perspectiva también señalamos que a pesar de que existen mecanismos de retroalimentación negativa local, las neuronas TRHérgicas del PVN de ratas anoréxicas escapan a tal regulación, por lo que la búsqueda de factores involucrados en dicha falta de respuesta requiere de mayor investigación.

1. Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res.* 2006;153:209-35.
2. Nillni EA, Sevarino KA. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev.* 1999 Oct;20:599-648.
3. Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 1982 Nov;257:275-325.
4. Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine-amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci.* 1999 May 15;19:RC5.
5. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Dec 8;95:15043-8.
6. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998 Aug;1:271-2.
7. Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci.* 1998;62:1443-8.
8. Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci.* 2000 Dec 20;85:18-25.
9. Vijayan E, McCann SM. Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology.* 1977 Jun;100:1727-30.
10. Morley JE. The neuroendocrine control of appetite: the role of the endogenous opiates, cholecystokinin, TRH, gamma-amino-butyric-acid and the diazepam receptor. *Life Sci.* 1980 Aug 4;27:355-68.
11. Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science.* 1986 Jan 10;231:159-61.
12. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 1987 Oct 2;238:78-80.
13. Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K, Suzuki M. Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology.* 1988 May;47:384-8.
14. Lechan RM. Update on thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid Today.* 1993;1:1-12.
15. Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Yasin M, Marshall JC. Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology.* 1992 May;130:2917-23.
16. Grosvenor CE, Mena F. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology.* 1980 Oct;107:863-8.
17. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001 Jul;81:1097-142.
18. Yamada M, Monden T, Satoh T, Iizuka M, Murakami M, Iriuchijima T, Mori M. Differential regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA levels by thyroid hormone in vivo and in vitro (GH3 cells). *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Apr 15;184:367-72.
19. Bauer K. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie.* 1988 Jan;70:69-74.

20. Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology*. 1988 Aug;48:211-3.
21. Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Deneef C. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology*. 1990 Sep;127:1224-33.
22. Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P. The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int*. 1988;13:237-42.
23. Cruz R, Vargas MA, Uribe RM, Pascual I, Lazcano I, Yiotakis A, Matziari M, Joseph-Bravo P, Charli JL. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 2008 Nov;29:1953-64.
24. Schomburg L, Bauer K. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 1995 Aug;136:3480-5.
25. Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology*. 1994 Sep;60:323-30.
26. Sanchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 2009 May;150:2283-91.
27. Danforth E, Burger A. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *Clin Endocrinol Metab*. 1984 Nov;13:581-95.
28. Onur S, Haas V, Bosy-Westphal A, Hauer M, Paul T, Nutzinger D, Klein H, Muller MJ. L-tri-iodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight patients with anorexia nervosa and during weight gain. *Eur J Endocrinol*. 2005 Feb;152:179-84.
29. Sell H, Deshaies Y, Richard D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Nov;36:2098-104.
30. Reitman ML, He Y, Gong DW. Thyroid hormone and other regulators of uncoupling proteins. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999 Jun;23 Suppl 6:S56-S59.
31. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett*. 2003 May 22;543:5-10.
32. Klieverik LP, Janssen SF, van Riel A, Foppen E, Bisschop PH, Serlie MJ, Boelen A, Ackermans MT, Sauerwein HP, et al. Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 7;106:5966-71.
33. Silva JE, Bianco SD. Thyroid-adrenergic interactions: physiological and clinical implications. *Thyroid*. 2008 Feb;18:157-65.
34. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nilni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*. 2006 Jun;147:2705-16.
35. Lechan RM, Qi Y, Jackson IM, Mahdavi V. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1994 Jul;135:92-100.
36. Satoh T, Yamada M, Iwasaki T, Mori M. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *J Biol Chem*. 1996 Nov 1;271:27919-26.

37. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest.* 2001 Apr;107:1017-23.
38. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem.* 2003 Oct 10;278:40128-35.
39. Friesema EC, Kuiper GG, Jansen J, Visser TJ, Kester MH. Thyroid hormone transport by the human monocarboxylate transporter 8 and its rate-limiting role in intracellular metabolism. *Mol Endocrinol.* 2006 Nov;20:2761-72.
40. Heuer H. The importance of thyroid hormone transporters for brain development and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun;21:265-76.
41. Jansen J, Friesema EC, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters in health and disease. *Thyroid.* 2005 Aug;15:757-68.
42. van der Deure WM, Peeters RP, Visser TJ. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J Mol Endocrinol.* 2010 Jan;44:1-11.
43. Heuer H, Maier MK, Iden S, Mittag J, Friesema EC, Visser TJ, Bauer K. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology.* 2005 Apr;146:1701-6.
44. Sugiyama D, Kusuhashi H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278:43489-95.
45. Trajkovic M, Visser TJ, Mittag J, Horn S, Lukas J, Darras VM, Raivich G, Bauer K, Heuer H. Abnormal thyroid hormone metabolism in mice lacking the monocarboxylate transporter 8. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117:627-35.
46. Dumitrescu AM, Liao XH, Weiss RE, Millen K, Refetoff S. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. *Endocrinology.* 2006 Sep;147:4036-43.
47. Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab.* 2008 Mar;19:50-6.
48. Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 2008 Dec;149:6251-61.
49. Kallo I, Mohacsik P, Vida B, Zeold A, Bardoczi Z, Zavacki AM, Farkas E, Kadar A, Hrabovszky E, et al. A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons. *PLoS One.* 2012;7:e37860.
50. Moreno M, Lanni A, Lombardi A, Goglia F. How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. *J Physiol.* 1997 Dec 1;505 (Pt 2):529-38.
51. Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med.* 1994 Sep 29;331:847-53.
52. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.* 2002 Feb;23:38-89.
53. Warner MH, Beckett GJ. Mechanisms behind the non-thyroidal illness syndrome: an update. *J Endocrinol.* 2010 Apr;205:1-13.
54. Toyoda N, Berry MJ, Harney JW, Larsen PR. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyronine deiodinase (D1). *J Biol Chem.* 1995 May 19;270:12310-8.

55. Silva JE, Larsen PR. Contributions of plasma triiodothyronine and local thyroxine monodeiodination to triiodothyronine to nuclear triiodothyronine receptor saturation in pituitary, liver, and kidney of hypothyroid rats. Further evidence relating saturation of pituitary nuclear triiodothyronine receptors and the acute inhibition of thyroid-stimulating hormone release. *J Clin Invest.* 1978 May;61:1247-59.
56. Larsen PR, Silva JE, Kaplan MM. Relationships between circulating and intracellular thyroid hormones: physiological and clinical implications. *Endocr Rev.* 1981 Dec;2:87-102.
57. Berry MJ, Kates AL, Larsen PR. Thyroid hormone regulates type I deiodinase messenger RNA in rat liver. *Mol Endocrinol.* 1990 May;4:743-8.
58. Berry MJ, Banu L, Larsen PR. Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. *Nature.* 1991 Jan 31;349:438-40.
59. Nishikawa M, Toyoda N, Yonemoto T, Ogawa Y, Tabata S, Sakaguchi N, Tokoro T, Gondou A, Yoshimura M, et al. Quantitative measurements for type 1 deiodinase messenger ribonucleic acid in human peripheral blood mononuclear cells: mechanism of the preferential increase of T3 in hyperthyroid Graves' disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Sep 29;250:642-6.
60. Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM. Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994 May;101:31-5.
61. Portnay GI, O'Brian JT, Bush J, Vagenakis AG, Azizi F, Arky RA, Ingbar SH, Braverman LE. The effect of starvation on the concentration and binding of thyroxine and triiodothyronine in serum and on the response to TRH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1974 Jul;39:191-4.
62. Economidou F, Douka E, Tzanela M, Nanas S, Kotanidou A. Thyroid function during critical illness. *Hormones (Athens).* 2011 Apr;10:117-24.
63. Burrows AW, Shakespear RA, Hesch RD, Cooper E, Aickin CM, Burke CW. Thyroid hormones in the elderly sick: "T4 euthyroidism". *Br Med J.* 1975 Nov 22;4:437-9.
64. Kaplan MM, Larsen PR, Crantz FR, Dzau VJ, Rossing TH, Haddow JE. Prevalence of abnormal thyroid function test results in patients with acute medical illnesses. *Am J Med.* 1982 Jan;72:9-16.
65. Safran M, Kohrle J, Braverman LE, Leonard JL. Effect of biological alterations of type I 5'deiodinase activity on affinity labeled membrane proteins in rat liver and kidney. *Endocrinology.* 1990 Feb;126:826-31.
66. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Surks MI. Propylthiouracil inhibits the conversion of L-thyroxine to L-triiodothyronine. An explanation of the antithyroxine effect of propylthiouracil and evidence supporting the concept that triiodothyronine is the active thyroid hormone. *J Clin Invest.* 1972 Sep;51:2493-7.
67. St Germain DL, Galton VA. The deiodinase family of selenoproteins. *Thyroid.* 1997 Aug;7:655-68.
68. Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR. Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology.* 1996 Aug;137:3308-15.
69. Bianco AC, Silva JE. Intracellular conversion of thyroxine to triiodothyronine is required for the optimal thermogenic function of brown adipose tissue. *J Clin Invest.* 1987 Jan;79:295-300.
70. Bianco AC, Silva JE. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology.* 1987 Jan;120:55-62.
71. Crantz FR, Silva JE, Larsen PR. An analysis of the sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine specifically bound to nuclear receptors in rat cerebral cortex and cerebellum. *Endocrinology.* 1982 Feb;110:367-75.
72. Baqui MM, Gereben B, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyronine deiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology.* 2000 Nov;141:4309-12.

73. Silva JE, Dick TE, Larsen PR. The contribution of local tissue thyroxine monodeiodination to the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine in pituitary, liver, and kidney of euthyroid rats. *Endocrinology*. 1978 Oct;103:1196-207.
74. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116:2571-9.
75. Heemstra KA, Soeters MR, Fliers E, Serlie MJ, Burggraaf J, van Doorn MB, van der Klaauw AA, Romijn JA, Smit JW, et al. Type 2 iodothyronine deiodinase in skeletal muscle: effects of hypothyroidism and fasting. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Jun;94:2144-50.
76. Araujo RL, Andrade BM, Padron AS, Gaidhu MP, Perry RL, Carvalho DP, Ceddia RB. High-fat diet increases thyrotropin and oxygen consumption without altering circulating 3,5,3'-triiodothyronine (T3) and thyroxine in rats: the role of iodothyronine deiodinases, reverse T3 production, and whole-body fat oxidation. *Endocrinology*. 2010 Jul;151:3460-9.
77. Hollenberg AN, Forrest D. The thyroid and metabolism: the action continues. *Cell Metab*. 2008 Jul;8:10-2.
78. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 1997 Aug;138:3359-68.
79. Bruni JE. Scanning and transmission electron microscopy of the ependymal lining of the third ventricle. *Can J Neurol Sci*. 1974 Feb;1:59-73.
80. Rodriguez EM, Gonzalez CB, Delannoy L. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res*. 1979 Oct;201:377-408.
81. Lechan RM, Qi Y, Berrodin TJ, Davis KD, Schwartz HL, Strait KA, Oppenheimer JH, Lazar MA. Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Endocrinology*. 1993 Jun;132:2461-9.
82. Dratman MB, Crutchfield FL, Gordon JT, Jennings AS. Iodothyronine homeostasis in rat brain during hypo- and hyperthyroidism. *Am J Physiol*. 1983 Aug;245:E185-E193.
83. van DJ, van der Heide D, Roelfsema F. Sources and quantity of 3,5,3'-triiodothyronine in several tissues of the rat. *J Clin Invest*. 1983 Nov;72:1778-92.
84. Kaplan MM. The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. *Neuroendocrinology*. 1984 Mar;38:254-60.
85. St Germain DL. The effects and interactions of substrates, inhibitors, and the cellular thiol-disulfide balance on the regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase. *Endocrinology*. 1988 May;122:1860-8.
86. Silva JE, Larsen PR. Comparison of iodothyronine 5'-deiodinase and other thyroid-hormone-dependent enzyme activities in the cerebral cortex of hypothyroid neonatal rat. Evidence for adaptation to hypothyroidism. *J Clin Invest*. 1982 Nov;70:1110-23.
87. St Germain DL. Metabolic effect of 3,3',5'-triiodothyronine in cultured growth hormone-producing rat pituitary tumor cells. Evidence for a unique mechanism of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 1985 Aug;76:890-3.
88. Leonard JL, Kaplan MM, Visser TJ, Silva JE, Larsen PR. Cerebral cortex responds rapidly to thyroid hormones. *Science*. 1981 Oct 30;214:571-3.
89. Burmeister LA, Pachucki J, St Germain DL. Thyroid hormones inhibit type 2 iodothyronine deiodinase in the rat cerebral cortex by both pre- and posttranslational mechanisms. *Endocrinology*. 1997 Dec;138:5231-7.
90. Kim SW, Harney JW, Larsen PR. Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology*. 1998 Dec;139:4895-905.

91. Guadano-Ferraz A, Escamez MJ, Rausell E, Bernal J. Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J Neurosci*. 1999 May 1;19:3430-9.
92. Huang SA, Tu HM, Harney JW, Venihaki M, Butte AJ, Kozakewich HP, Fishman SJ, Larsen PR. Severe hypothyroidism caused by type 3 iodothyronine deiodinase in infantile hemangiomas. *N Engl J Med*. 2000 Jul 20;343:185-9.
93. Schoenmakers CH, Pigmans IG, Visser TJ. Investigation of type I and type III iodothyronine deiodinases in rat tissues using N-bromoacetyl-iodothyronine affinity labels. *Mol Cell Endocrinol*. 1995 Feb;107:173-80.
94. Kaplan MM, Yaskoski KA. Phenolic and tyrosyl ring deiodination of iodothyronines in rat brain homogenates. *J Clin Invest*. 1980 Sep;66:551-62.
95. Tu HM, Legradi G, Bartha T, Salvatore D, Lechan RM, Larsen PR. Regional expression of the type 3 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in the rat central nervous system and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 1999 Feb;140:784-90.
96. Chopra IJ. A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T4) to 3,3',5-triiodothyronine (T3) in vitro. *Endocrinology*. 1977 Aug;101:453-63.
97. Green WL. Metabolism of thyroid hormones by rat thyroid tissue in vitro. *Endocrinology*. 1978 Sep;103:826-37.
98. St Germain DL. Development effects of thyroid hormone: the role of deiodinases in regulatory control. *Biochem Soc Trans*. 1999 Feb;27:83-8.
99. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeold A, Bianco AC. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev*. 2008 Dec;29:898-938.
100. St Germain DL. Selenodeiodinases: Preceptor Regulators of Thyroid Action. *Thyroid Today*. 1999;22:1-11.
101. Herwig A, Ross AW, Nilaweera KN, Morgan PJ, Barrett P. Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts*. 2008;1:71-9.
102. Bianco AC, Maia AL, da Silva WS, Christoffolete MA. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci Rep*. 2005 Jun;25:191-208.
103. Leibel RL, Rosenbaum M, Hirsch J. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med*. 1995 Mar 9;332:621-8.
104. Sims EA, Danforth E. Expenditure and storage of energy in man. *J Clin Invest*. 1987 Apr;79:1019-25.
105. Shibata H, Bukowiecki LJ. Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats. *J Appl Physiol*. 1987 Aug;63:465-70.
106. Rondeel JM, Heide R, de Greef WJ, van Toor H, van Haasteren GA, Klootwijk W, Visser TJ. Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 1992 Sep;56:348-53.
107. van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, et al. 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*. 1995 Apr;145:143-53.
108. van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol*. 1996 Aug;150:169-78.

109. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology*. 1991 Nov;129:2714-8.
110. Kakucska I, Qi Y, Lechan RM. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1995 Jul;136:2795-802.
111. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1997 Jun;138:2569-76.
112. Seoane LM, Carro E, Tovar S, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo TSH secretion by leptin. *Regul Pept*. 2000 Aug 25;92:25-9.
113. Nilni EA, Vaslet C, Harris M, Hollenberg A, Bjorbak C, Flier JS. Leptin regulates prothyrotropin-releasing hormone biosynthesis. Evidence for direct and indirect pathways. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275:36124-33.
114. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest*. 1996 Sep 1;98:1101-6.
115. Mihaly E, Fekete C, Tatro JB, Liposits Z, Stopa EG, Lechan RM. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jul;85:2596-603.
116. Fekete C, Kelly J, Mihaly E, Sarkar S, Rand WM, Legradi G, Emerson CH, Lechan RM. Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*. 2001 Jun;142:2606-13.
117. Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, Emerson CH, Lechan RM. 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*. 2000 Feb 15;20:1550-8.
118. Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL. Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1998 Jun;139:2879-84.
119. Coppola A, Meli R, Diano S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology*. 2005 Jun;146:2827-33.
120. O'Mara BA, Dittrich W, Lauterio TJ, St Germain DL. Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology*. 1993 Oct;133:1715-23.
121. al-Adsani H, Hoffer LJ, Silva JE. Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Apr;82:1118-25.
122. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol*. 2007 Aug;28:97-114.
123. Mantzoros CS. Leptin and the hypothalamus: neuroendocrine regulation of food intake. *Mol Psychiatry*. 1999 Jan;4:8-7.
124. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*. 1998 Feb 20;92:437-40.
125. Vogel RA, Cooper BR, Barlow TS, Prange AJ, Jr., Mueller RA, Breese GR. Effects of thyrotropin-releasing hormone on locomotor activity, operant performance and ingestive behavior. *J Pharmacol Exp Ther*. 1979 Feb;208:161-8.
126. Morley JE, Levine AS. Thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses stress induced eating. *Life Sci*. 1980 Jul 21;27:269-74.

127. Choi YH, Hartzell D, Azain MJ, Baile CA. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav.* 2002 Sep;77:1-4.
128. Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine mediates the thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J Neurochem.* 2007 Nov;103:1102-10.
129. Schuhler S, Warner A, Finney N, Bennett GW, Ebling FJ, Brameld JM. Thyrotrophin-releasing hormone decreases feeding and increases body temperature, activity and oxygen consumption in Siberian hamsters. *J Neuroendocrinol.* 2007 Apr;19:239-49.
130. Unikel C VV. Conductas alimentarias de riesgo en adolescentes mexicanos. Datos en población estudiantil del Distrito Federal. *Rev Invest Clin (México).* 2002;52:140-7.
131. Smink FR, van HD, Hoek HW. Epidemiology of eating disorders: incidence, prevalence and mortality rates. *Curr Psychiatry Rep.* 2012 Aug;14:406-14.
132. Munoz MT, Argente J. Anorexia nervosa in female adolescents: endocrine and bone mineral density disturbances. *Eur J Endocrinol.* 2002 Sep;147:275-86.
133. Vermes I, Beishuizen A. The hypothalamic-pituitary-adrenal response to critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;15:495-511.
134. Stoving RK, Hangaard J, Hansen-Nord M, Hagen C. A review of endocrine changes in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res.* 1999 Mar;33:139-52.
135. Debaveye Y, Ellger B, Mebis L, Van Herck E, Coopmans W, Darras V, Van den Berghe G. Tissue deiodinase activity during prolonged critical illness: effects of exogenous thyrotropin-releasing hormone and its combination with growth hormone-releasing peptide-2. *Endocrinology.* 2005 Dec;146:5604-11.
136. Kiyohara K, Tamai H, Takaichi Y, Nakagawa T, Kumagai LF. Decreased thyroidal triiodothyronine secretion in patients with anorexia nervosa: influence of weight recovery. *Am J Clin Nutr.* 1989 Oct;50:767-72.
137. Brambilla F, Santonastaso P, Caregaro L, Favaro A. Disorders of eating behavior: correlation between hypothalamo-pituitary-thyroid function and psychopathological aspects. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 Jan;31:131-6.
138. Tamai H, Mori K, Matsubayashi S, Kiyohara K, Nakagawa T, Okimura MC, Walter RM, Kumagai LF, Nagataki S. Hypothalamic-pituitary-thyroidal dysfunctions in anorexia nervosa. *Psychother Psychosom.* 1986;46:127-31.
139. Troisi A, Di Lorenzo G, Lega I, Tesauro M, Bertoli A, Leo R, Iantorno M, Pecchioli C, Rizza S, et al. Plasma ghrelin in anorexia, bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology.* 2005;81:259-66.
140. Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A. Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005 Sep;289:373-81.
141. Estour B, Germain N, Diconne E, Frere D, Cottet-Emard JM, Carrot G, Lang F, Galusca B. Hormonal profile heterogeneity and short-term physical risk in restrictive anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 May;95:2203-10.
142. Fliers E, Alkemade A, Wiersinga WM. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001 Dec;15:453-64.
143. Watts AG. Dehydration-associated anorexia: development and rapid reversal. *Physiol Behav.* 1999 Jan 1;65:871-8.

144. Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly AB. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J Neurosci*. 1999 Jul 15;19:6111-21.
145. Cullen MJ, Ling N, Foster AC, Pellemounter MA. Urocortin, corticotropin releasing factor-2 receptors and energy balance. *Endocrinology*. 2001 Mar;142:992-9.
146. Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. 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. *Horm Behav*. 2008 Feb;53:366-77.
147. Gershengorn MC, Osman R. Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev*. 1996 Jan;76:175-91.
148. Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 1993 Jul;58:140-5.
149. Sanchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P. 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*. 2001 Dec;74:407-22.
150. de Gortari P, Mancera K, Cote-Velez A, Amaya MI, Martinez A, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology*. 2009 Feb;34:259-72.
151. Portela de Santana ML, da Costa Ribeiro JH, Mora GM, Raich RM. [Epidemiology and risk factors of eating disorder in adolescence: a review]. *Nutr Hosp*. 2012 Mar;27:391-401.
152. Uribe RM, Zacarias M, Corkidi G, Cisneros M, Charli JL, Joseph-Bravo P. 17beta-Oestradiol indirectly inhibits thyrotrophin-releasing hormone expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of female rats and blunts thyroid axis response to cold exposure. *J Neuroendocrinol*. 2009 May;21:439-48.
153. Ueta Y, Dayanithi G, Fujihara H. Hypothalamic vasopressin response to stress and various physiological stimuli: visualization in transgenic animal models. *Horm Behav*. 2011 Feb;59:221-6.
154. Malendowicz LK, Spinazzi R, Nowak KW, Nussdorfer GG, Majchrzak M. Effects of arginine vasopressin (AVP) on the pituitary-thyroid axis in the rat: Evidence that endogenous AVP, acting via V1 receptors, lowers TSH blood concentration. *Int J Mol Med*. 2004 Jun;13:869-72.
155. Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 2006 May;27:260-86.
156. Swanson SA, Crow SJ, Le Grange D, Swendsen J, Merikangas KR. Prevalence and correlates of eating disorders in adolescents. Results from the national comorbidity survey replication adolescent supplement. *Arch Gen Psychiatry*. 2011 Jul;68:714-23.
157. van Son GE, van HD, Bartelds AI, van Furth EF, Hoek HW. Time trends in the incidence of eating disorders: a primary care study in the Netherlands. *Int J Eat Disord*. 2006 Nov;39:565-9.
158. Currin L, Schmidt U, Treasure J, Jick H. Time trends in eating disorder incidence. *Br J Psychiatry*. 2005 Feb;186:132-5.
159. Isomaa R, Isomaa AL, Marttunen M, Kaltiala-Heino R, Bjorkqvist K. The prevalence, incidence and development of eating disorders in Finnish adolescents: a two-step 3-year follow-up study. *Eur Eat Disord Rev*. 2009 May;17:199-207.
160. Keski-Rahkonen A, Hoek HW, Susser ES, Linna MS, Sihvola E, Raevuori A, Bulik CM, Kaprio J, Rissanen A. Epidemiology and course of anorexia nervosa in the community. *Am J Psychiatry*. 2007 Aug;164:1259-65.

Referencias bibliográficas

161. Wade TD, Bergin JL, Tiggemann M, Bulik CM, Fairburn CG. Prevalence and long-term course of lifetime eating disorders in an adult Australian twin cohort. *Aust N Z J Psychiatry*. 2006 Feb;40:121-8.
162. Bulik CM, Sullivan PF, Tozzi F, Furberg H, Lichtenstein P, Pedersen NL. Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Mar;63:305-12.
163. Unikel C, Root T, Vonholle A, Ocampo R, Bulik CM. Disordered eating and substance use among a female sample of Mexican adolescents. *Subst Use Misuse*. 2011;46:523-34.
164. Silva JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid*. 1995 Dec;5:481-92.
165. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86:435-64.
166. Van Wymelbeke V, Brondel L, Marcel Brun J, Rigaud D. Factors associated with the increase in resting energy expenditure during refeeding in malnourished anorexia nervosa patients. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80:1469-77.
167. Reinehr T, Isa A, de Sousa G, Dieffenbach R, Andler W. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm Res*. 2008;70:51-7.
168. Garcia-Luna C, Amaya MI, Alvarez-Salas E, de Gortari P. Prepro-orexin and feeding-related peptide receptor expression in dehydration-induced anorexia. *Regul Pept*. 2010 Jan 8;159:54-60.
169. Schmitz GG, Walter T, Seibl R, Kessler C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem*. 1991 Jan;192:222-31.
170. Landry M, Roche D, Vila-Porcile E, Calas A. Effects of centrally administered galanin (1-16) on galanin expression in the rat hypothalamus. *Peptides*. 2000 Nov;21:1725-33.
171. Merchenthaler I, Liposits Z. Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biol Hung*. 1994;45:361-74.
172. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. USA: Elsevier; 2005.
173. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162:156-9.
174. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.
175. Vargas MA, Bourdais J, Sanchez S, Uriostegui B, Moreno E, Joseph-Bravo P, Charli JL. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *J Neuroendocrinol*. 1998 Mar;10:199-206.
176. Watts AG, Boyle CN. The functional architecture of dehydration-anorexia. *Physiol Behav*. 2010 Jul 14;100:472-7.
177. Watts AG, Kelly AB, Sanchez-Watts G. Neuropeptides and thirst: the temporal response of corticotropin-releasing hormone and neurotensin/neuromedin N gene expression in rat limbic forebrain neurons to drinking hypertonic saline. *Behav Neurosci*. 1995 Dec;109:1146-57.
178. Watts AG. Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm Behav*. 2000 Jun;37:261-83.
179. Visser TJ, Kaplan MM, Leonard JL, Larsen PR. Evidence for two pathways of iodothyronine 5'-deiodination in rat pituitary that differ in kinetics, propylthiouracil sensitivity, and response to hypothyroidism. *J Clin Invest*. 1983 Apr;71:992-1002.

180. Kohrle J. Thyroid hormone deiodination in target tissues--a regulatory role for the trace element selenium? *Exp Clin Endocrinol.* 1994;102:63-89.
181. Denereaz N, Lemarchand-Beraud T. Severe but not mild alterations of thyroid function modulate the density of thyroid-stimulating hormone receptors in the rat thyroid gland. *Endocrinology.* 1995 Apr;136:1694-700.
182. Baratti-Elbaz C, Ghinea N, Lahuna O, Loosfelt H, Pichon C, Milgrom E. Internalization and recycling pathways of the thyrotropin receptor. *Mol Endocrinol.* 1999 Oct;13:1751-65.
183. Franklyn J. The Thyroid - too much and too little across the ages. The consequences of subclinical thyroid dysfunction. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2012 Aug 14.
184. Michalaki MA, Vagenakis AG, Leonardou AS, Argentou MN, Habeos IG, Makri MG, Psyrogiannis AI, Kalfarentzos FE, Kyriazopoulou VE. Thyroid function in humans with morbid obesity. *Thyroid.* 2006 Jan;16:73-8.
185. Garduno-Garcia JJ, Alvirde-Garcia U, Lopez-Carrasco G, Padilla Mendoza ME, Mehta R, Arellano-Campos O, Choza R, Sauque L, Garay-Sevilla ME, et al. TSH and free thyroxine concentrations are associated with differing metabolic markers in euthyroid subjects. *Eur J Endocrinol.* 2010 Aug;163:273-8.
186. Sherman TG, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Watson SJ. Coordinate expression of hypothalamic prodynorphin and pro-vasopressin mRNAs with osmotic stimulation. *Neuroendocrinology.* 1986;44:222-8.
187. Meister B, Cortes R, Villar MJ, Schalling M, Hokfelt T. Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res.* 1990 May;260:279-97.
188. Ciosek J, Drobnik J. Vasopressin and oxytocin release and the thyroid function. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Jun;55:423-41.
189. Aceves C, Escobar C, Rojas-Huidobro R, Vazquez-Martinez O, Martinez-Merlos T, Aguilar-Roblero R, Diaz-Munoz M. Liver 5'-deiodinase activity is modified in rats under restricted feeding schedules: evidence for post-translational regulation. *J Endocrinol.* 2003 Oct;179:91-6.
190. Araujo RL, de Andrade BM, de Figueiredo AS, da Silva ML, Marassi MP, Pereira VS, Bouskela E, Carvalho DP. Low replacement doses of thyroxine during food restriction restores type 1 deiodinase activity in rats and promotes body protein loss. *J Endocrinol.* 2008 Jul;198:119-25.
191. Silva JE, Larsen PR. Potential of brown adipose tissue type II thyroxine 5'-deiodinase as a local and systemic source of triiodothyronine in rats. *J Clin Invest.* 1985 Dec;76:2296-305.
192. Lisboa PC, Passos MC, Dutra SC, Santos RS, Bonomo IT, Cabanelas AP, Pazos-Moura CC, Moura EG. Increased 5'-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation. *J Endocrinol.* 2003 May;177:261-7.
193. Wu SY, Wright C, Parker LN, Florsheim W. Induction of type II T4-5'-monodeiodinase activity in brown adipose tissue in fasted mice. *Am J Med Sci.* 1990 Jan;299:21-5.
194. Dentice M, Marsili A, Ambrosio R, Guardiola O, Sibilio A, Paik JH, Minchiotti G, DePinho RA, Fenzi G, et al. The FoxO3/type 2 deiodinase pathway is required for normal mouse myogenesis and muscle regeneration. *J Clin Invest.* 2010 Nov 1;120:4021-30.
195. Dentice M, Luongo C, Huang S, Ambrosio R, Elefante A, Mirebeau-Prunier D, Zavacki AM, Fenzi G, Grachtchouk M, et al. Sonic hedgehog-induced type 3 deiodinase blocks thyroid hormone action enhancing proliferation of normal and malignant keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep 4;104:14466-71.
196. Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell.* 2004 May 14;117:421-6.

197. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab.* 2007 Dec;6:472-83.
198. Kwakkel J, van Beeren HC, Ackermans MT, Platvoet-Ter Schiphorst MC, Fliers E, Wiersinga WM, Boelen A. Skeletal muscle deiodinase type 2 regulation during illness in mice. *J Endocrinol.* 2009 Nov;203:263-70.
199. Moreno M, Berry MJ, Horst C, Thoma R, Goglia F, Harney JW, Larsen PR, Visser TJ. Activation and inactivation of thyroid hormone by type I iodothyronine deiodinase. *FEBS Lett.* 1994 May 16;344:143-6.
200. Kohrle J, Schomburg L, Drescher S, Fekete E, Bauer K. Rapid stimulation of type I 5'-deiodinase in rat pituitaries by 3,3',5-triiodo-L-thyronine. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 Feb 27;108:17-21.
201. Cettour-Rose P, Visser TJ, Burger AG, Rohner-Jeanrenaud F. Inhibition of pituitary type 2 deiodinase by reverse triiodothyronine does not alter thyroxine-induced inhibition of thyrotropin secretion in hypothyroid rats. *Eur J Endocrinol.* 2005 Sep;153:429-34.
202. Araujo RL, Andrade BM, da Silva ML, Ferreira AC, Carvalho DP. Tissue-specific deiodinase regulation during food restriction and low replacement dose of leptin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 May;296:1157-63.
203. Boelen A, Kwakkel J, Vos XG, Wiersinga WM, Fliers E. Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J Endocrinol.* 2006 Aug;190:537-44.
204. Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A, Jameson JL. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Dec;86:9114-8.
205. Wondisford FE, Farr EA, Radovick S, Steinfeldt HJ, Moates JM, McClaskey JH, Weintraub BD. Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin beta-subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *J Biol Chem.* 1989 Sep 5;264:14601-4.
206. St Germain DL, Galton VA. Comparative study of pituitary-thyroid hormone economy in fasting and hypothyroid rats. *J Clin Invest.* 1985 Feb;75:679-88.
207. Koenig RJ. Regulation of thyroxine 5'-deiodinase by thyroid hormones and activators of protein kinase C in GH4C1 cells. *Endocrinology.* 1986 Apr;118:1491-7.
208. Kohrle J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol.* 1999 May 25;151:103-19.
209. Marassi MP, Fortunato RS, da Silva AC, Pereira VS, Carvalho DP, Rosenthal D, da Costa VM. Sexual dimorphism in thyroid function and type 1 iodothyronine deiodinase activity in pre-pubertal and adult rats. *J Endocrinol.* 2007 Jan;192:121-30.
210. Wittmann G, Fuzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol.* 2009 Jul 20;515:313-30.
211. Kawano H, Tsuruo Y, Bando H, Daikoku S. Hypophysiotrophic TRH-producing neurons identified by combining immunohistochemistry for pro-TRH and retrograde tracing. *J Comp Neurol.* 1991 May 22;307:531-8.
212. Nishiyama T, Kawano H, Tsuruo Y, Maegawa M, Hisano S, Adachi T, Daikoku S, Suzuki M. Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing neurons involved in the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. Light microscopic immunohistochemistry. *Brain Res.* 1985 Oct 21;345:205-18.
213. Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, et al. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-

- synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci*. 2000 Dec 15;20:9224-34.
214. Legradi G, Lechan RM. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1999 Aug;140:3643-52.
215. Mihaly E, Fekete C, Legradi G, Lechan RM. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res*. 2001 Feb 9;891:20-31.
216. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006 Sep 21;443:289-95.
217. Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol*. 2008 Jul;93:773-97.
218. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80:1523-631.
219. Dannies PS, Tashjian AH. Pyroglutamyl-histidyl-prolineamide (TRH). A neurohormone which affects the release and synthesis of prolactin and thyrotropin. *Isr J Med Sci*. 1974 Oct;10:1294-304.
220. Goldstein J, Perello M, Nillni EA. PreproThyrotropin-releasing hormone 178-199 affects tyrosine hydroxylase biosynthesis in hypothalamic neurons: a possible role for pituitary prolactin regulation. *J Mol Neurosci*. 2007;31:69-82.
221. Santini F, Pinchera A, Ceccarini G, Castagna M, Rosellini V, Mammoli C, Montanelli L, Zucchi V, Chopra IJ, Chiovato L. Evidence for a role of the type III-iodothyronine deiodinase in the regulation of 3,5,3'-triiodothyronine content in the human central nervous system. *Eur J Endocrinol*. 2001 Jun;144:577-83.
222. Escamez MJ, Guadano-Ferraz A, Cuadrado A, Bernal J. Type 3 iodothyronine deiodinase is selectively expressed in areas related to sexual differentiation in the newborn rat brain. *Endocrinology*. 1999 Nov;140:5443-6.
223. Freitas BC, Gereben B, Castillo M, Kallo I, Zeold A, Egri P, Liposits Z, Zavacki AM, Maciel RM, et al. Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. *J Clin Invest*. 2010 Jun;120:2206-17.
224. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010 Apr;31:139-70.
225. Martinez B, Rodrigues TB, Gine E, Kaninda JP, Perez-Castillo A, Santos A. Hypothyroidism decreases the biogenesis in free mitochondria and neuronal oxygen consumption in the cerebral cortex of developing rats. *Endocrinology*. 2009 Aug;150:3953-9.
226. Laughlin SB, de Ruyter van Steveninck RR, Anderson JC. The metabolic cost of neural information. *Nat Neurosci*. 1998 May;1:36-41.
227. Horvath TL, Warden CH, Hajos M, Lombardi A, Goglia F, Diano S. Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. *J Neurosci*. 1999 Dec 1;19:10417-27.
228. Nakahara K, Takata S, Ishii A, Nagao K, Bannai M, Takahashi M, Murakami N. Somatostatin is involved in anorexia in mice fed a valine-deficient diet. *Amino Acids*. 2011 Feb 4.
229. Frank GK, Bailer UF, Henry SE, Drevets W, Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Wagner A, Hoge J, et al. Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and. *Biol Psychiatry*. 2005 Dec 1;58:908-12.
230. Brambilla F, Cocchi D, Nobile P, Muller EE. Anterior pituitary responsiveness to hypothalamic hormones in anorexia nervosa. *Neuropsychobiology*. 1981;7:225-37.

Referencias bibliográficas

231. Krassas GE. Endocrine abnormalities in Anorexia Nervosa. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2003 Sep;1:46-54.
232. Misra M, Klibanski A. Neuroendocrine consequences of anorexia nervosa in adolescents. *Endocr Dev.* 2010;17:197-214.

ANEXOS

Food-Restricted and Dehydrated-Induced Anorexic Rats Present Differential TRH Expression in Anterior and Caudal PVN. Role of Type 2 Deiodinase and Pyroglutamyl Aminopeptidase II

E. Alvarez-Salas, C. Aceves, B. Anguiano, R. M. Uribe, C. García-Luna, E. Sánchez, and P. de Gortari

Neurofisiología Molecular (E.A.-S., C.G.-L., P.de.G.), Neuroendocrinología Molecular (E.S.), Escuela de Dietética y Nutrición ISSSTE, México D.F., México (E.A.-S., C.G.-L.), Dirección de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, México D.F., México; Instituto de Neurobiología (C.A., B.A.), Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, 76230, México; Instituto de Biotecnología (R.M.U.), Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Mor 62210 Cuernavaca, Morelos, México

TRH synthesized in hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) regulates thyroid axis function and is also implicated in anorexigenic effects. Under energy deficit, animals present decreased PVN TRH expression and release, low TSH levels, and increased appetite. Dehydration-induced anorexia (DIA) model allows insight into underlying mechanisms of feeding regulation. Animals drinking a 2.5% NaCl solution for 7 d present body weight reduction; despite their negative energy balance, they avoid food and have increased PVN TRH expression and TSH serum levels. These findings support an inhibiting role of PVN TRH in feeding control. We compared TRH expression by *in situ* hybridization in PVN subdivisions of 7-d dehydrated male rats to those of a pair-fed group (forced food-restricted) with similar metabolic changes than DIA, but motivated to eat, and to controls. We measured peripheral deiodinase activities, and expression and activity of medial basal hypothalamic type 2 deiodinase and pyroglutamyl-aminopeptidase II, to understand their regulating role in PVN TRH changes between food restriction and anorexia. TRH mRNA levels increased in anterior (aPVN) and medial-caudal subdivisions in DIA rats, whereas it decreased in medial PVN in both experimental groups. We confirmed the nonhypophysiotropic nature of aPVN TRHergic cells by injecting ip fluoro-gold tracer. Findings support a subspecialization of TRHergic hypophysiotropic cells that responded differently between anorexic and food-restricted animals; also, that aPVN TRH participates in food intake regulation. Increased type 2 deiodinase activity seemed responsible for low medial PVN TRH synthesis, whereas increased medial basal hypothalamic pyroglutamyl-aminopeptidase II activity in DIA rats might counteract their high TRH release. (*Endocrinology* 153: 4067–4076, 2012)

Regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis function by TRH is extensively studied. Cell bodies synthesizing hypophysiotropic TRH are confined to medial and paraventricular parvocellular subdivisions of hypothalamic paraventricular nucleus (PVN); axons of these cells project to the median eminence (ME) where the peptide is released into the pituitary portal blood.

Acting through its receptor TRH-R1 in the thyrotropes, TRH activates synthesis and release of TSH that, in turn, induces the secretion of thyroid hormones (TH) T₃, T₄, from the thyroid to the peripheral blood. By controlling TH serum concentration, hypothalamic TRH indirectly regulates energy utilization and basal metabolic rate.

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.

Copyright © 2012 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/en.2011-2011 Received November 18, 2011. Accepted June 1, 2012.

First Published Online June 19, 2012

Abbreviations: AgRP, Agouti-related protein; aPVN, anterior PVN; ARC, arcuate hypothalamic nucleus; AVP, vasopressin; BAT, brown adipose tissue; CART, cocaine and amphetamine-regulated transcript; cPVN, medial-caudal PVN; D1 and D2, type 1 and 2 deiodinase; DIA, dehydration-induced anorexia; DTT, dithiothreitol; FFR, forced food-restricted; G3PDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; HPT, hypothalamic-pituitary-thyroid; ISH, *in situ* hybridization; MBH, medial basal hypothalamus; ME, median eminence; mPVN, medial PVN; NPY, neuropeptide Y; PPII, pyroglutamyl aminopeptidase II; PVN, paraventricular nucleus; TH, thyroid hormone; TRH-βNA, TRH-β-naphthylamide.

Anterior part of PVN (aPVN) contains TRH-expressing neurons that are not involved in hypophysiotropic functions of the peptide (1); aPVN TRH neurons possibly regulate homeostatic and behavioral functions at hypothalamic and forebrain levels such as locomotion, thermoregulation, and food intake (2).

Both, medial (mPVN) and anterior subsets of PVN TRHergic neurons receive afferent connections from arcuate hypothalamic nucleus (ARC) a region involved in regulation of food intake and fuel expenditure (3–5), supporting that PVN TRH expressing cells are implicated in both aspects of energy homeostasis. Evidence suggesting an involvement of TRH in appetite regulation is the fact that its icv injection reduces food consumption in both *ad libitum* or food-restricted animals (6–8). Additionally, PVN TRH expression is positively modulated by anorexigenic signals [leptin, α -MSH, cocaine, and amphetamine-regulated transcript (CART)] and negatively by orexigenic peptides [neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP)] (9).

During caloric restriction low circulating leptin levels decelerate HPT axis function (10, 11) and increase food intake (12); TRH release from medial basal hypothalamus (MBH) also decreases in parallel to serum TSH and TH levels. Adaptation of HPT axis is advantageous to the survival of fasted animals by saving their energy deposits.

Animals subjected to dehydration-induced anorexia (DIA) spontaneously reduce their food intake and body weight despite their negative energy balance. In contrast to fasting or food restriction, DIA rats have increased PVN TRH mRNA expression (by RT-PCR) and higher serum TSH content compared with those of a pair-fed group (forced food-restricted FFR) (13) even though both present similar metabolic changes (reduced leptin and increased corticosterone serum levels), up-regulation of ARC orexigenic, and decreased anorexigenic peptide expression (14); in contrast to the food-avoiding behavior of DIA, FFR animals would eat if food was offered.

Increased PVN TRH mRNA expression of DIA group returns to levels observed in FFR rats if an antagonist of CRH-2 receptor is injected into the PVN (15). The antagonist also decreases TSH serum content but only attenuates food-avoiding behavior of anorexic rats, suggesting that at least some part of the medial hypophysiotropic TRHergic cells are activated in DIA, but that a different subset of neurons not having a neuroendocrine function should be responsible for the aberrant behavior displayed by those animals; this also suggests that in addition to CRH, other factors might be involved in TRH mRNA changes.

To study the participation of TRH in food intake separately from its actions as an activator of HPT axis, we

performed *in situ* hybridization (ISH) analysis, to identify whether specific PVN TRHergic cells are differentially activated between DIA and FFR animals accounting for their discrepancies in feeding and HPT axis function (13, 16). Our results showed that when compared with FFR, anorexic rats had higher TRH expression in aPVN that might regulate food intake; DIA animals also presented an increased TRH synthesis in the caudal part of the medial hypophysiotropic PVN (cPVN), which may explain their altered TSH secretion.

Given that MBH type 2 iodothyronine deiodinase (D2) activity regulates local PVN T_3 concentrations (17) and is proposed to be responsible for the decreased TRH expression in fasted and food-restricted animals (18, 19), we tried to define whether differences in D2 synthesis and activity between DIA and FFR animals could account for their different TRH expression of hypophysiotropic cells. We also identified whether differences in type 1 and 2 deiodinase activities (D1, D2) in liver, muscle, brown adipose tissue (BAT), and pituitary between experimental animals could account for the lower body weight or altered serum TSH levels observed in anorexic rats.

Because TRH is degraded by pyroglutamyl aminopeptidase II (PPII) enzyme, which is expressed in tanycytes of MBH, in close apposition to hypophysiotropic TRHergic nerve ends, we analyzed PPII activity and mRNA expression in experimental animals. Tanycyte PPII activity, which was recently identified as a central regulatory element of TRH release (20, 21), would have an important role in the different TRH metabolism between DIA and FFR.

Materials and Methods

Animals

All experiments were approved by the Ethics Committee of Instituto Nacional de Psiquiatría (INPRFM) following the guidelines of Neuroscience Society (USA). Male Wistar adult rats (250–270 g) from INPRFM's animal house were allowed to acclimatize to light-dark cycle (lights on from 0700 h to 1900 h), temperature (23 ± 1 C), and *ad libitum* access to food and tap water, for 1 wk.

Experiments

Animals were housed in individual cages 1 wk before the experiment and randomly selected to form three groups as described elsewhere (13). On d 1, control group received tap water and food *ad libitum*, the DIA group had access to a 2.5% NaCl (Sigma, St. Louis, MO) solution as drinking liquid (14), and the FFR group received the amount of solid food ingested by DIA animals on the previous day and tap water *ad libitum*. Solid food (Lab rodent diet no.5001; PMI Feeds; Brentwood, MO), liquid ingestion, and body weight were measured daily at 1700 h in all

groups. Six independent experiments were performed, lasting 1 wk. On the first day of the experiment a set of rats (C, DIA, and FFR groups, $n = 3$) received an ip injection of fluorogold (Fluorochrome LLC, Denver, CO) 15 mg/kg of body weight in saline solution (0.9%) (2.5 ml). Fluorogold would be transported retrogradely by terminal ends of hypophysiotropic cells from the median eminence to the neural perikarya in the PVN, where it would be concentrated (1). On d 7 animals were killed by decapitation (1100 h–1200 h) and trunk blood was collected for hormone measurements; brain, anterior pituitary gland, liver, BAT, and hindlimb muscle tissues were excised and kept frozen at -70 C until analysis.

From one set of animals a coronal thick slice, approximately -0.6 to -3.6 mm from bregma (22) was hand dissected from frozen brains, by cutting transversally to obtain MBH for PPII and D2 activity assays. MBH (height, 8.2–9.8 mm; length, -1.0 to 1.0 mm) was defined rostrally by the optic chiasm, caudally by the mamillary bodies, laterally by the optic tract, and superiorly by the apex of third ventricle. PVN was punch dissected with a 1.0-mm diameter sample corer (height, 7.2–8.2 mm; length, -0.5 to 0.5 mm) to measure vasopressin (AVP) mRNA levels by RT-PCR. Brains of remaining experiments were sliced for ISH analyses, as described below.

AVP mRNA semiquantification by RT-PCR

Total RNA from PVN was extracted using guanidine thiocyanate (ICN Biochemicals, Inc., Aurora, OH) as previously described (23). PVN mRNA levels of AVP were semiquantified; cyclophilin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) were used as control transcripts. As reported previously (24), cDNA was prepared from 1.5 μ g RNA [Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), oligo-dT, and specific oligonucleotides synthesized at the Biotechnology Institute facilities in the University of Mexico (UNAM)]. Number of cycles for each probe was optimized using 25 pmol of (sense: 5'-CACCTCTGCCTGCTACTTCC-3', antisense: 5'-GGGCAGGTAGTTCTCCTCCT-3') together with 50 pmol of cyclophilin (sense: 5'-GGGGAGAAAGGATTTGGCTA-3', antisense: 5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC-3') or G3PDH (sense: 5'-CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC-3', antisense: 5' TGAAGGTCCGTGTCAACGGATTTGGC-3'), and 0.5 μ l Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) (Biotecnologías Universitarias, University of Mexico, Mexico City). cDNA (4 μ l) was used and final assay conditions were: 22 cycles for AVP and 21 for cyclophilin or G3PDH. Each cycle consisted of: 1 min at 94 C, followed by 1 min at 64 C and a final minute at 72 C. All cDNA had a final extension of 10 min at 72 C. cDNA were semiquantified from the same reverse transcriptase reaction.

PCR products were separated by 2% agarose (Ultra-pure-Bio-Rad; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA) gel electrophoresis and stained with ethidium bromide (1 mg/liter); OD was measured with Fluor-S Multi-Imager instrument (Bio-Rad Laboratories). Relative amounts of AVP cDNA were calculated as a ratio of AVP cDNA OD over that of cyclophilin or G3PDH. Ratio of G3PDH/cyclophilin cDNA was evaluated to identify possible variations between groups in expression of these markers.

Serum hormone levels

Serum TSH content was quantified by RIA with the NIDDK (National Hormone and Pituitary Program) protocol and materials using 50 μ l of serum diluted 1:3 with RIA buffer [limit of detection: 5 pg, 13% interassay, 6% intraassay variability]. Serum (100 and 25 μ l, respectively) was used to measure T₃ and T₄, with commercial RIA kits (Coat-A-Count Solid-Phase ¹²⁵I RIA. Total T₃ DPC TKT31, Total T₄ DPC TKT41, Los Angeles, CA) [analytical sensitivity: T₃, 7 ng/dl and T₄, 0.25 μ g/dl; interassay variability: T₃, T₄ < 15%, and intraassay variability T₃ or T₄ < 9%]. AVP was measured in 100 μ l of serum by ELISA (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY); sensitivity, 3.39 pg/ml.

Enzyme activity assays

Iodothyronine deiodinase activities

D1 and D2 activities were measured by the radioiodine release method (25) using ¹²⁵rT₃ (1250 μ Ci/ μ g, PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA) as substrate. Tissues were homogenized in 10 vol (wt/vol) of ice-cold 0.01 M HEPES buffer (pH 7.5) containing 0.32 M sucrose, 10 mM dithiothreitol (DTT), and 1 mM EDTA. Crude homogenates were centrifuged at 1200 \times g for 20 min at 4 C, and enzymatic activity was determined in supernatant. Assays were carried out to determine optimal conditions for protein concentration and incubation time. Standard assay contained 50 μ l of homogenate equivalent to 10 (liver), 40 (pituitary), 100 (MBH), 300 (muscle), and 600 (BAT) μ g of protein, and 50 μ l of radiolabeled mixture (2 nM [¹²⁵I]rT₃ and either 5 mM DTT for liver or 20 mM DTT for the other tissues) in a final volume of 100 μ l. For liver assays, 10 μ M nonradiolabeled rT₃ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) was added. Pituitary D2 activity was measured in the presence of 1 mM 6-n-propyl-2-thiouracyl (D1 inhibition). After incubation (1–3 h at 37 C), reactions were stopped with 3% BSA and 1 mM 6-n-propyl-2-thiouracyl, followed by the addition of trichloroacetic acid (10%) and centrifuged at 12,000 \times g. Released ¹²⁵I was isolated by cation exchange chromatography on Dowex 50W-X2 columns (Bio-Rad, Hercules, CA) and counted in a γ -counter. Parallel control tubes without homogenate were included in each assay. Proteins were measured by Bradford method (26). Results are expressed as femtomoles or picomoles of ¹²⁵I released per h per mg protein.

PPII activity

MBH was dissected from coronal sliced brains. The hypothalamic region between optic chiasm and mamillary bodies, containing the ME, ARC, and periventricular area, was cut and used for analysis. PPII activity was determined as described (27). Briefly, membranes from MBH were prepared by centrifugation for 15 min at 14,000 \times g. Pellets were homogenized in 180 μ l of 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5). Membrane PPII activity was determined with the substrate TRH- β -naphthylamide (TRH- β NA) in a coupled assay in the presence of excess dipeptidyl aminopeptidase IV (4 nmol Gly-Pro- β NA hydrolyzed per minute), 0.2 mM N-ethylmaleimide, and 0.2 mM bacitracin (10–50 μ g protein/assay). Enzymatic reaction was initiated by adding 400 μ M TRH- β NA to the reaction mixture (total volume of 250 μ l) and carried out in duplicate at 37 C. At 0, 90, 150, and 210 min, 50 μ l were withdrawn, and the reaction was stopped by adding 50 μ l 100% methanol. Aliquots were diluted to 400 μ l

TABLE 1. D1 and D2 activities in peripheral tissues

Group	Liver D1 (pmol ¹²⁵ I/mg protein/h)	Muscle D1, D2 (fmol ¹²⁵ I/mg protein/h)	BAT D2 (fmol ¹²⁵ I/mg protein/h)	Pituitary	
				D1 (pmol ¹²⁵ I/mg protein/h)	D2 (fmol ¹²⁵ I/mg protein/h)
Control	1209 ± 106	53.1 ± 9.7	7.5 ± 1.6	549 ± 33	102.5 ± 17
FFR	742 ± 107 ^a	18 ± 4.8 ^a	16 ± 2.9 ^a	193 ± 45 ^a	53 ± 6 ^a
DIA	854 ± 88 ^a	62 ± 9 ^b	20.1 ± 4 ^a	1135 ± 136 ^{a,b}	165 ± 23 ^{a,b}

D1 specific activity was performed in liver and pituitary tissues, D2 activity was performed in BAT and pituitary and total deiodinase activity was performed in muscle of animals of different groups euthanized on d 7 of DIA experiment, using radioiodine release method. Values are expressed as the mean ± SEM in picomoles ¹²⁵I/mg protein/h (liver and pituitary D1) or in femtomoles ¹²⁵I/mg protein/h (BAT and pituitary D2, and muscle total deiodinase activity). One-way ANOVA showed significant differences in muscle ($F_{(2,24)} = 4.9$; $P < 0.05$), liver ($F_{(2,38)} = 5.81$; $P < 0.01$); ^a, when $P < 0.01$; for pituitary D1 ($F_{(2,37)} = 20.1$, $P < 0.0001$), ^a, $P < 0.0001$, for pituitary D2 ($F_{(2,48)} = 10.5$, $P < 0.001$), ^a, $P < 0.001$ and BAT ($F_{(2,33)} = 4.48$, $P < 0.05$), ^a, $P < 0.05$ vs. control; and ^b, $P < 0.05$ vs. FFR values.

with 50% methanol before detecting βNA release in a fluorometer (excitation, 335 nm; emission, 410 nm). An aliquot was kept for protein quantification by the Bradford method (26) using a dye reagent concentrate protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Activity was linear during 3.5 h and referred to as membrane protein content.

ISH histochemistry

Brains stored at -70 C were allowed to temper at -20 C for 1 h inside a microtome cryostat (Microm HM 525; Carl Zeiss IMT Corp., Maple Grove, MN). Serial coronal slices (14 μm thick) were cut in the cryostat beginning at bregma -1.1 mm and ending at bregma -3.2 mm (22), adhered to superfrost/Plus slides (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), and stored at -70 C. Three slices per slide were collected; first slices corresponded to aPVN (-1.1 to -1.5 mm from bregma), next group to mPVN (-1.5 to -2.0 mm from bregma), last slices comprised both cPVN (-2.0 to -2.3 mm from bregma) and MBH (-2.0 to -3.2 mm from bregma).

Different sets of contiguous slices were hybridized with 1) 1241-bp single-stranded [³⁵S]UTP-labeled cRNA probe generated from pro-TRH cDNA (28); 2) 800-bp single stranded [³⁵S]UTP-labeled cRNA probe complementary to the entire coding region of the rat D2 gene (29); and 3) mixture of two oligonucleotides complementary to PPII mRNA (GenBank accession no. *inside brackets*) (5'-GAGCAGTACGCCAGCATGGTGACAGCCAGCAGTCCACGATGGACACGG-3' that hybridizes with nucleotides 207–256 and 5'-TCAGCACCACCACCAAGACCTGCGTTTGTGGGTAGAGGAAAAGCCTGCT-3' that hybridizes with nucleotides 690–739 [NM_001108991.1] from rat PPII cDNA) labeled by 3'-tailing with [³⁵S]d-ATP (1250 Ci/mmol; PerkinElmer, Waltham, MA).

Hybridization with oligonucleotides was performed as described by de Gortari and Mengod (30), whereas the procedure used for cRNA was described by Sánchez *et al.* (31). Briefly, for both procedures, tissues were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and immersed in pronase (24 U/ml). Hybridizations were performed in a buffer containing 50% formamide/4× standard saline citrate, 10% dextran sulfate, 1× Denhardt's solution (0.02% BSA, 0.02% Ficoll 400, 0.02% polyvinylpyrrolidone), 1% sarkosyl, 20 mM phosphate buffer (pH 7.0), 250 μg/ml yeast tRNA, 500 μg/ml sonicated denatured salmon sperm DNA, 5 M DTT, and 10–20 × 10⁶ cpm radiolabeled oligo probe per ml of hybridization buffer for 16 h at 42 C or 5 × 10⁵ cpm radiolabeled cRNA probe per 20 μl of hybridization buffer for 16 h at 56 C.

Slides were washed with a buffer containing 0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and dipped into Kodak NTB autoradiography emulsion diluted 1:1 in distilled water (Eastman Kodak, Rochester, NY). Autoradiograms were developed after 2–9 wk of exposure at 4 C: 2 wk for D2, 3 wk for TRH, and 9 wk for PPII.

Identification of TRHergic nonhypophysiotropic cells in the PVN

Brains of fluorogold-injected rats were excised and sliced in dim light conditions, to obtain anterior, medial, and caudal subregions of PVN, as described above. Oligonucleotides used were complementary to the following base sequences: TRH, bases 105–149, 427–471, 559–603 [NM_013046.2] were labeled with terminal deoxynucleotidyltransferase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and Digoxygenin-11-UTP (Roche Diagnostics GmbH) as described elsewhere (32). Two picomoles of labeled oligonucleotides/ml hybridization cocktail of the mixture of three probes were used to hybridize the sections as described previously (33). Briefly, after washing, slides were immersed in a buffer containing 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1 M NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.5% BSA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) and incubated at 4 C overnight with rhodamine-conjugated antidigoxygenin-F(ab) fragments (1:200; Roche Diagnostics GmbH). Afterward, slides were rapidly immersed in the same buffer (without antibody), once in PBS for 10 min, and mounted with 50% glycerol on 1×PBS.

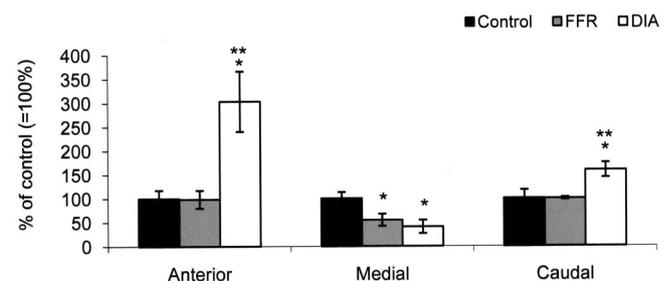


FIG. 1. aPVN, mPVN, and medial caudal PVN TRH mRNA expression by ISH. Changes on TRH mRNA levels in different subdivisions of PVN of controls, FFR, and DIA animals killed on d 7 of the experiment and quantified by ISH histochemistry. Values are expressed as the mean ± SEM of percentage of control data (= 100%) of integrated OD; one-way ANOVA of aPVN data showed ($F_{(2, 14)} = 15.5$; $P < 0.01$), for mPVN ($F_{(2, 10)} = 5$; $P < 0.05$), and for cPVN ($F_{(2, 12)} = 4.5$; $P < 0.05$). *, $P < 0.01$ vs. control; **, $P < 0.01$ vs. FFR.

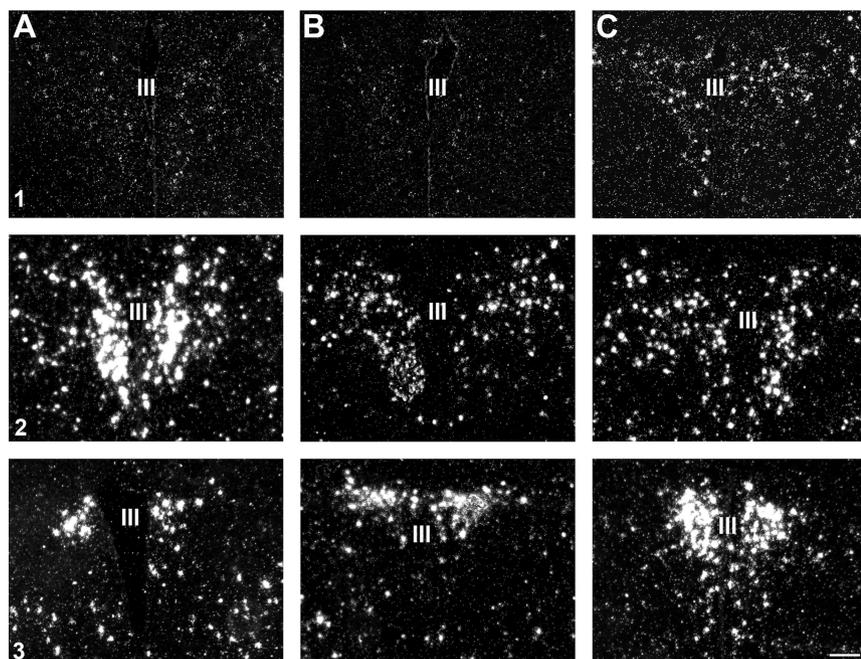


FIG. 2. Dark-field illumination micrographs of representative samples of pro-TRH mRNA in PVN. Images are low-power magnifications of anterior (1), medial (2), and caudal (3) subdivisions of the PVN of control (A), FFR (B), and DIA (C) animals. III, Third ventricle. Scale bar, 200 μ m.

Image analysis

Autoradiograms were visualized with an Olympus BH-2 imaging microscope (New York Microscope Co., Inc., Hicksville, NY) under bright- and/or dark-field illumination using an Evolution MP Media Cybernetics video camera (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD). Images were captured with a $\times 4$ or $\times 40$ objective and analyzed by computer using Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, Inc.). Integrated OD values of PVN (TRH) or MBH (PPII and D2) (minus background) were measured in six rostrocaudal sections for each animal.

Fluorogold on brain sections was visualized at $\times 40$ with a fluorescence microscope (Olympus BX51, Olympus America, Inc.) using a U-MWU2 filter (excitation, 330–385; emission, 420 nm). Hypophysiotropic positive neurons corresponded to blue stained cells. PVN TRHergic cells were identified using a U-MNG2 filter (excitation, 530–550 nm; emission, 590 nm); positive neurons were stained with red. Images were captured with a $\times 10$ or $\times 40$ objective and analyzed by computer using Image-Pro Plus 7.0 software (Media Cybernetics, Inc.). Integrated OD values of rhodamine-labeled TRH cells (minus background) were measured in six sections of aPVN for each animal; mean of six OD values was taken as $n = 1$ (total $n = 3$ /group). For the analysis, we discarded those sections of the aPVN that showed fluorogold labeling, which corresponded to the interphase between the anterior and medial part of the PVN. We also excluded from the analysis the periventricular zone of the aPVN that contains some hypophysiotropic neurons.

Statistical analysis

Two-way ANOVA was performed to analyze body weight and food intake of a different group of animals at each day of the experiment; one-way ANOVA was used for the remainder of the

determinations. When significant ($P < 0.05$), analysis was followed by a Fisher's *post hoc* test.

Results

Food intake and body weight

As previously observed, food intake and body weight were reduced in DIA animals starting on the first and second day of the experiment, respectively, *vs.* controls (13). As reported by Jaimes-Hoy *et al.* (13), body weight loss was greater in DIA *vs.* FFR since d 2 (data not shown).

Serum hormone levels

TSH serum concentration decreased 30% (0.94 ± 0.1 ng/ml) in FFR group *vs.* controls (1.6 ± 0.2 ng/ml); in contrast, DIA group showed an almost 2-fold increase (2.8 ± 0.6 ng/ml Student's *t* test, $P < 0.05$) *vs.* controls. T_4 content decreased in both experimental

groups (DIA: 2.7 ± 0.3 ; FFR: 3.75 ± 0.3 μ g/dl) *vs.* controls (5.9 ± 0.44 μ g/dl); moreover, DIA animals had a greater reduction *vs.* FFR ($F_{(2, 77)} = 34$; $P < 0.0001$).

T_3 concentration decreased to 42 ± 5 and to 27 ± 5 ng/dl in FFR and DIA animals, respectively, *vs.* controls (59 ± 1.6 ng/dl; $F_{(2, 21)} = 15.57$; $P < 0.0001$).

AVP serum levels were not different among groups. Control values: 33.5 ± 9.8 ; FFR: 44 ± 3.6 ; and DIA: 32.2 ± 5.8 pg/ml. One-way ANOVA showed $F_{(2, 16)} = 0.911$, $P > 0.05$.

Type 1 and 2 deiodinase activities in peripheral tissues

Liver D1 activity decreased to $61 \pm 9\%$ and $71 \pm 7\%$ in FFR and DIA animals, respectively, *vs.* controls ($100 \pm 9\%$). Skeletal muscle total deiodinase activity increased in DIA when compared to FFR group, whereas a decrease to $34 \pm 8\%$ was observed in the latter *vs.* controls ($100 \pm 17\%$). D2 activity from BAT increased more than 2-fold in FFR ($214.1 \pm 39.8\%$) and DIA animals ($266 \pm 54\%$) *vs.* controls ($100 \pm 21\%$). D1 activity increased 2-fold in anterior pituitary of DIA group ($205 \pm 25\%$), whereas in FFR rats it decreased to $35 \pm 6\%$ *vs.* controls ($100 \pm 9\%$). D2 activity increased in the DIA group to $161 \pm 23\%$ and decreased to $52 \pm 6\%$ in FFR animals *vs.* controls ($100 \pm 17\%$) (Table 1).

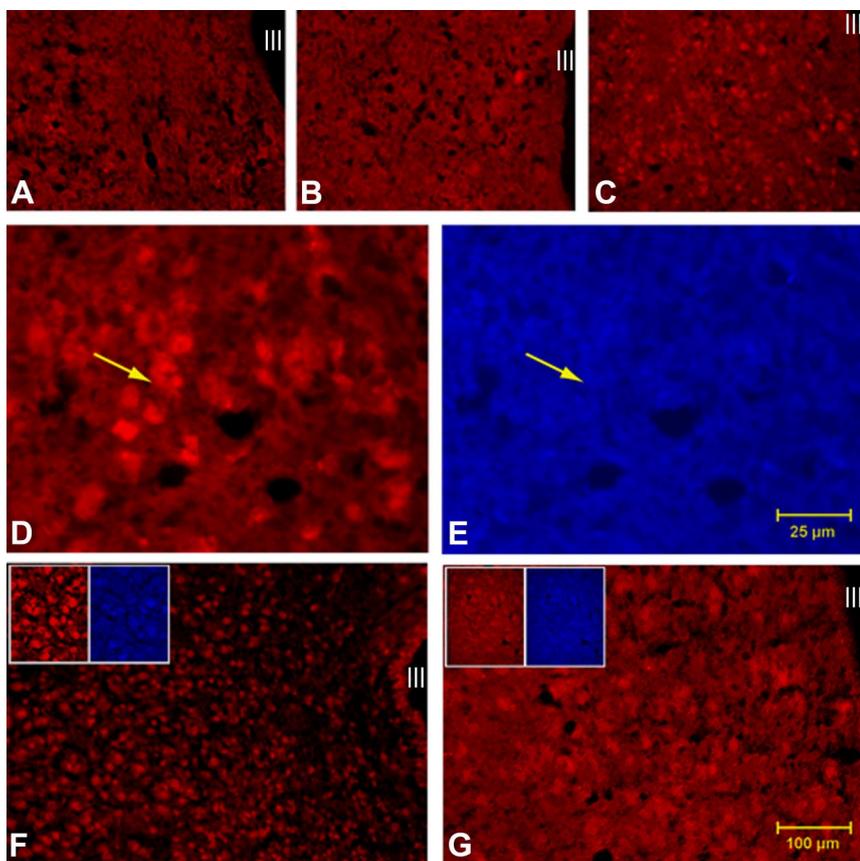


FIG. 3. Photomicrographs ($\times 10$ magnification) showing rhodamine-labeled TRHergic cells in the aPVN subregion of control (panel A), FFR (panel B), and DIA animals (panel C) injected ip with fluorogold tracer. D, $\times 40$ magnification of rhodamine-labeled TRHergic cells visualized with the red filter of aPVN of anorexic animals. E, The same analyzed area with no fluorogold tracer. F, Photomicrograph ($\times 10$) shows TRHergic cells labeled with rhodamine in the mPVN or cPVN (panel G) of control animals. Inserts show $\times 40$ magnifications of TRHergic cells labeled (red) and that of fluorogold-labeled cells (blue). Scale bar, $100 \mu\text{m}$ in $\times 10$ magnifications and $25 \mu\text{m}$ in $\times 40$ photomicrographs. One-way ANOVA of the integrated OD of the rhodamine signal in the aPVN of groups of animals showed that $F_{(2, 6)} = 18$; $P < 0.01$.

AVP mRNA expression by RT-PCR

To analyze whether some changes in DIA animals might be due to AVP levels, we analyzed its expression in PVN and found it enhanced in both experimental groups *vs.* controls (FFR, $173 \pm 3\%$; DIA, $157 \pm 3\%$; control, $100 \pm 2\%$; $F_{(2, 15)} = 616.7$; $P < 0.0001$).

ISH histochemistry of pro-TRH mRNA in PVN

For analytical purposes we subdivided the PVN into three zones, as previously described (31): aPVN (-1.1 to -1.5 mm from bregma), mPVN (-1.5 to -2.0 mm from bregma), and cPVN (-2.0 to 2.3 mm from bregma).

ISH experiments showed differences in pro-TRH expression among groups depending on PVN subdivision. TRH expression in aPVN enhanced in DIA animals ($303 \pm 63\%$) by approximately 3-fold *vs.* controls ($100 \pm 17\%$) and also *vs.* FFR group ($95 \pm 19\%$). mPVN of both experimental groups showed decreased pro-TRH mRNA levels to $55 \pm 13\%$ and $41 \pm 14\%$ in FFR and DIA animals, respectively,

vs. controls ($100 \pm 13\%$), secondary to negative energy balance. Finally, TRH mRNA levels increased in cPVN of DIA ($159 \pm 16\%$) *vs.* controls ($100 \pm 18\%$) and also *vs.* FFR ($100 \pm 2\%$) animals (Figs. 1 and 2).

Nonhypophysiotropic nature of TRHergic PVN neurons

By injecting ip fluorogold to animals of the three groups, we were able to quantify the TRHergic nonhypophysiotropic cells in the aPVN of DIA rats and compared them with those of control and FFR animals. We found that TRH expression, visualized as rhodamine signal, was increased to $165 \pm 2\%$ in the aPVN of DIA animals (Fig. 3C) when compared with that of controls ($100 \pm 15\%$) (Fig. 3A) and FFR ($92 \pm 7\%$) (Fig. 3B). Figure 3, D and E, depicts amplifications at $\times 40$ of the rhodamine signal (panel D) and the lack of fluorogold-containing cells in the aPVN of anorexic animals (panel E). This result confirmed that anorexic rats had a greater pro-TRH expression in the aPVN than control and FFR rats and that this was found in nonhypophysiotropic neurons. We confirmed the successful fluorogold labeling by visualizing a double labeling, with rhodamine and fluorogold tracer, in TRHergic cells of medial (Fig. 3F) and caudal PVN (Fig. 3G).

D2 activity and mRNA content by ISH in MBH

FFR group showed increased D2 activity (FFR: $165 \pm 12\%$; C: $100 \pm 11\%$, 26 ± 3 fmol \cdot l/h/mg protein) as observed in fasted animals (18); in DIA, it increased to $226 \pm 29\%$ *vs.* controls and was also enhanced *vs.* FFR values (Fig. 4A).

D2 expression increased 2-fold in FFR ($262 \pm 51\%$) and 4-fold in DIA animals ($402 \pm 51\%$) *vs.* controls ($100 \pm 17\%$) (Figs. 4B and Fig. 5).

PPII-specific activity and mRNA content by ISH in MBH

PPII activity slightly decreased in FFR ($82 \pm 7\%$) *vs.* control animals ($100 \pm 10\%$, 25 ± 2 pmol β NA/min/mg protein), whereas in DIA group it increased ($136 \pm 17\%$) *vs.* FFR (Fig. 6A).

PPII mRNA levels changed similarly to its activity: enzyme expression decreased in FFR *vs.* controls ($48 \pm 4\%$ *vs.* $100 \pm 12\%$) and increased in DIA ($130 \pm 22\%$) *vs.* FFR rats (Figs. 6B and Fig. 7).

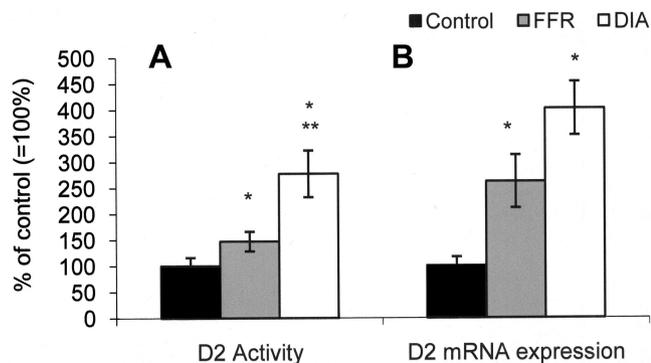


FIG. 4. MBH D2 activity and mRNA expression by ISH. D2 specific activity and mRNA levels in MBH of control, FFR, and DIA animals killed on d 7. A, D2 enzyme activity determination was performed by radiolabeled iodide (^{125}I) release technique. Values are expressed as the mean \pm SEM of percent of control (100%). Control values of D2 specific activity were 23.8 ± 3.8 fmol ^{125}I /mg protein/h. One-way ANOVA showed ($F_{(2, 41)} = 8.77$; $P < 0.001$). B, D2 mRNA content was measured by ISH histochemistry ($F_{(2, 5)} = 11.2$; $P < 0.05$). Values are expressed as the mean \pm SEM of percent of control (=100%) integrated OD. *, $P < 0.01$ vs. control; **, $P < 0.01$ vs. FFR.

Discussion

Hypothalamic neurons regulate energy homeostasis by adjusting fuel degradation to nutrient availability of animals but also, by controlling their food intake; under negative energy balance, animals have increased appetite and reduced energy utilization. TRHergic cells of mPVN and cPVN are hypophysiotropic; by controlling HPT axis, TRH regulates thermogenesis, metabolic rate, and energy homeostasis. TRH is also implicated in anorexic effects, because its icv injection reduces feeding in animals (6–8) and also because hypothalamic TRH-synthesizing neurons coexpress receptors for orexigenic and anorexigenic peptides; NPY and AgRP inhibit whereas α -MSH and leptin stimulate TRH expression (34).

In an attempt to separate TRH effects in feeding from its hypophysiotropic role, we subjected animals to DIA and compared their PVN TRH expression with that of animals under similar negative energy balance but with

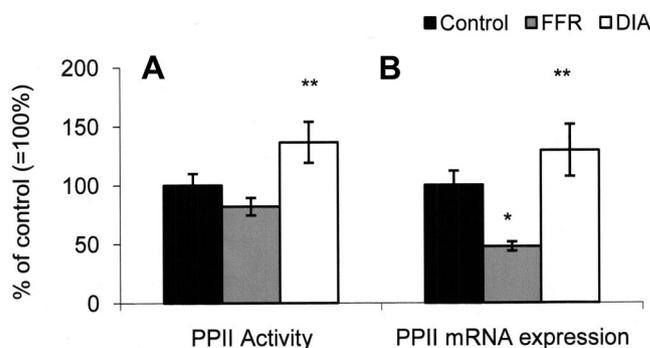


FIG. 6. MBH PPII activity and mRNA expression by ISH. PPII specific activity and mRNA levels in MBH of control, FFR, and DIA animals killed on d 7. A, PPII activity determination was performed by fluorometric assay. Values are expressed as the mean \pm SEM of percent of change vs. control data (=100%). One-way ANOVA showed ($F_{(2, 10)} = 4.4$; $P < 0.05$). Control values of PPII specific activity were 25.3 ± 2.5 pmol/min/mg of protein. B, mRNA content was measured by ISH histochemistry. Values are expressed as the mean \pm SEM of percentage of control data (=100%), of integrated OD; one-way ANOVA showed ($F_{(2, 7)} = 8.67$; $P < 0.05$). *, $P < 0.05$ vs. control; **, $P < 0.05$ vs. FFR.

differential motivation to eat (FFR). DIA animals avoid food despite their increased orexigenic neuropeptide synthesis (NPY), decreased expression of anorexigenic brain signals (α -MSH) (14), reduced leptin, and high corticosterone serum levels (13, 14), which suggest that their feeding-regulatory pathways are impaired.

We have previously observed that TRH expression in whole PVN (by semiquantitative RT-PCR), peptide release, and TSH serum content increase in anorexic animals vs. FFR and controls (13). ISH study showed here that TRH expression in a subset of hypophysiotropic cells (mPVN) decreased in DIA and FFR groups, suggesting that HPT changes of anorexic animals were not due to activation of TRHergic neurons of this part of PVN. However, we found that in the caudal part of medial PVN (cPVN), hypophysiotropic TRHergic cells were activated only in the DIA group. This might explain enhanced TRH release and altered TSH serum levels in DIA vs. FFR animals (13). Our results pointed to a subspecialization of hypophysiotropic TRHergic cells, which is supported by the uneven distribution of ARC α -MSH and CART afferents between medial and caudal TRH-expressing cells (5, 35) and by the diverse origin of projections of ARC NPY-expressing cells to TRHergic hypophysiotropic cells (3). These findings agreed with the increased *c-fos* expression in cPVN but not in mPVN neurons observed in DIA animals (36). This leads to a heterogeneous control of TRH expression in hypophysiotropic cells by known regulating factors. Sub-

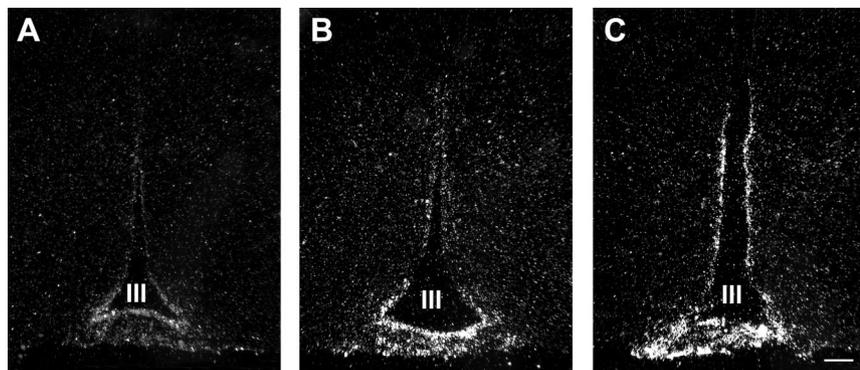


FIG. 5. Dark-field illumination micrographs demonstrating *in situ* hybridization products of D2 mRNA in the ME. Images are low-power magnifications of MBH of control (A), FFR (B), and DIA (C) animals. III, Third ventricle. Scale bar, 200 μm .

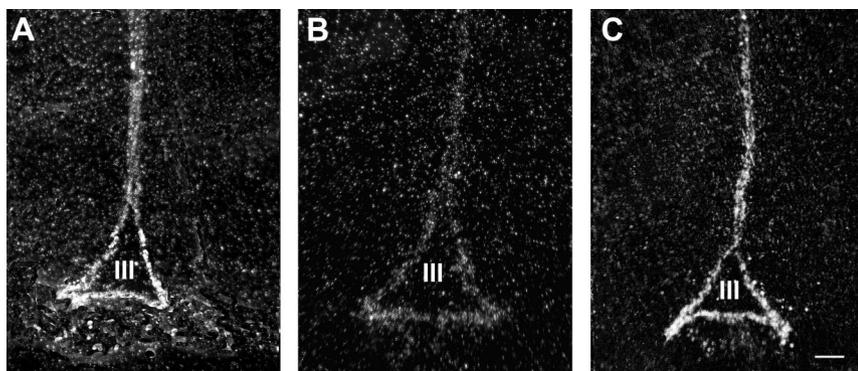


FIG. 7. Dark-field illumination micrographs demonstrating ISH products of PPII mRNA in the periventricular zone, ARC, and ME. Images are low-power magnifications of MBH of control (A), FFR (B), and DIA (C) animals. III, Third ventricle. Scale bar, 200 μm .

specialization of PVN cells also raises the possibility that activation of cPVN neurons in DIA may overcome inhibition of other TRHergic hypophysiotropic cells, changing their resultant TRH release to the portal blood.

TRH mRNA levels increased in aPVN cells of DIA animals; most of these neurons do not project into ME (37), but to ARC and dorsomedial hypothalamic nuclei that regulate food intake; also to brain regions involved in other aspects of feeding such as motivation and locomotion (2). We confirmed that the enhanced TRH expression observed in the aPVN of anorexic rats occurred in TRHergic nonhypophysiotropic cells. This was possible by injecting animals ip with fluorogold tracer and observing an increased signal of rhodamine-labeled TRHergic cells that did not contain fluorogold in aPVN. Thus, it is likely that anorexic behavior of DIA animals might result (at least in part), from activation of those cells. Interconnections of aPVN TRHergic cells with feeding-regulatory centers are also evidenced by the robust innervations they receive from ARC AgRP/NPY and α -MSH/CART-expressing neurons (3).

Given that PVN vasopressinergic cells are activated during dehydration (38, 39), we ruled out AVP participation in TSH release and HPT axis abnormalities of DIA animals by observing that their PVN mRNA levels were similarly increased as in FFR and by the similar AVP serum content found in both experimental groups *vs.* controls. Our results are in agreement with others (40) that observe increased AVP hypothalamic content (probably due to high synthesis) in dehydrated rats but inhibited peptide release from the neurohypophysis *vs.* euthyroid-euhydrated and *vs.* hypothyroid-euhydrated animals.

MBH deiodinase (D2) expression and activity

D2 expressed in tanycytes of third ventricle is responsible for local T_3 content (29). Increased D2 activity in fasted animals (18) elevates hypothalamic T_3 concentration, which diminishes PVN TRH expression (18). Because tissue T_3 concentration regulated by deiodinases does not necessarily

reflect hormone serum levels (41–43), we compared MBH D2 activity and expression between experimental animals that presented low T_3 circulating content. We found, as expected, the increased D2 expression and activity in FFR animals but also in DIA, which might induce their similar decreased TRH synthesis in mPVN. However, because TRH expression was increased in cPVN only in DIA rats, this argues in favor of different responsive subsets of hypophysiotropic TRHergic neurons to the increased activity of MBH D2. To understand the differential response of hypophysiotropic

TRH cells found here, it would be interesting to analyze the expression pattern of TH transporters (MCT8, OATP1c1) in mPVN *vs.* cPVN TRHergic hypophysiotropic cells.

Peripheral deiodinases activity

Distinct body weight loss between experimental groups, despite their identical food intake and decreased serum TH levels, led us to analyze deiodinase activities in peripheral tissues that might contribute to the resulting high TSH serum concentration and weight loss in DIA.

Only muscle and pituitary had differential deiodinase activities; other tissues responded similarly in both groups, most likely due to their low circulating TH levels. Increased total deiodinase activity and likely high T_3 levels in skeletal muscle of DIA animals might contribute to atrophy of myocytes and to their higher weight loss than FFR. This was consistent with the observed elevation of deiodinase activity in muscle of ill mice, which is not related to a diminished food intake (44). Pituitary D2 activity of FFR decreased as observed in fasted animals (45), whereas the DIA group had increased D1 and D2 activities. Enhanced pituitary D2 activity seemed not the explanation of the high TSH levels of DIA animals because local T_3 content might also be elevated, which is known to decrease TSH synthesis (46). Our results would better support differential MBH TRH release of anorexic animals as the main factor involved in their serum TSH levels. High TRH release from ME of DIA animals might increase pituitary D2 activity, as observed in cultured cells added with the peptide (47, 48).

MBH pyroglutamyl aminopeptidase expression and activity

We analyzed PPII activity to determine whether TRH degradation step in MBH might be relevant for differential peptide release and TSH serum levels between DIA and FFR animals.

MBH PPII activity and expression were found increased in the DIA and decreased in the FFR group. The higher PPII activity in anorexic animals might be degrading TRH (which is highly released in those animals) to normalize TSH levels and HPT axis function, in a long term; this is supported by the inappropriately low TSH levels of the DIA group, given their greater decrease of TH serum levels when compared with FFR values. In a long term, this might induce the non-thyroidal illness condition of anorexic patients (49), which is characterized by normal TSH levels and by a deregulated HPT axis function (50).

In the present paper, we are giving evidence for activation of TRHergic nonhypophysiotropic neurons in aPVN of anorexic animals that might be participating in their food intake inhibition. Results suggested a subspecialization of TRHergic hypophysiotropic neurons that responded differently depending on the stimulus that caused the negative energy balance.

An implication of our results in anorexia nervosa is the possibility that patients might have an increased TRH synthesis from a subset of hypophysiotropic cells that, in early phases of illness, favors high peptide release from ME and in a long term might induce desensitization of pituitary TRH receptors [as a down-regulation of TRH-R1 receptors is described in DIA (13)]. This is relevant, because one of the most common HPT axis alterations of anorexic patients is the retarded pituitary TSH response to TRH administration (51, 52).

If during development of anorexia there is an activation of counteracting mechanisms to restore HPT axis homeostasis, as the high MBH TRH-degrading enzyme activity observed in DIA animals, this would help to understand the normal or subnormal TSH serum levels of anorexic patients (53).

Acknowledgments

We thank José Luis Calderón and Raúl Cardoso for drawing assistance, we also thank María Isabel Amaya and Gilberto Matamoros Trejo for technical support.

Address all correspondence and requests for reprints to: Patricia de Gortari, Ph.D., Neurofisiología Molecular, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM), Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, C.P. 14370, México D.F., México. E-mail: gortari@imp.edu.mx.

This work was supported by CONACyT 128316.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Merchenthaler I, Liposits Z 1994 Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biol Hung* 45:361–374
2. Wittmann G, Füzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C 2009 Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol* 515:313–330
3. Légrádi G, Lechan RM 1998 The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139:3262–3270
4. Mihály E, Fekete C, Tatro JB, Liposits Z, Stopa EG, Lechan RM 2000 Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and α -melanocyte-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2596–2603
5. Fekete C, Mihály E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH, Jackson IM, Lechan RM 2000 Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci* 20:9224–9234
6. Vijayan E, McCann SM 1977 Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 100:1727–1730
7. 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
8. Horita A 1998 An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci* 62:1443–1448
9. Lechan RM, Fekete C 2006 The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* 153:209–235
10. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL 1991 Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129:2714–2718
11. Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM 1997 Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138:2569–2576
12. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250–252
13. Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P 2008 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. *Horm Behav* 53:366–377
14. Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly AB 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
15. de Gortari P, Mancera K, Cote-Vélez A, Amaya MI, Martínez A, Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P 2009 Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 34:259–272
16. García-Luna C, Amaya MI, Alvarez-Salas E, de Gortari P 2010 Prepro-orexin and feeding-related peptide receptor expression in dehydration-induced anorexia. *Regul Pept* 159:54–60
17. Diano S, Naftolin F, Goglia F, Csernus V, Horvath TL 1998 Monosynaptic pathway between the arcuate nucleus expressing glial type II iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and the median eminence-projective TRH cells of the rat paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 10:731–742
18. Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL 1998 Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger

- ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139:2879–2884
19. 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
 20. Sánchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM 2009 Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 150:2283–2291
 21. Marsili A, Sanchez E, Singru P, Harney JW, Zavacki AM, Lechan RM, Larsen PR 2011 Thyroxine-induced expression of pyroglutamyl peptidase II and inhibition of TSH release precedes suppression of TRH mRNA and requires type 2 deiodinase. *J Endocrinol* 211:73–78
 22. Paxinos G, Watson C 2005 *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. San Diego, CA: Elsevier
 23. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
 24. Aguilar-Valles A, Sánchez E, de Gortari P, Balderas I, Ramirez-Amaya V, Bermúdez-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
 25. Anguiano B, Aranda N, Delgado G, Aceves C 2008 Epididymis expresses the highest 5'-deiodinase activity in the male reproductive system: kinetic characterization, distribution, and hormonal regulation. *Endocrinology* 149:4209–4217
 26. Bradford MM 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
 27. Vargas MA, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL 2000 Regulation of adenylyltransferase pyroglutamyl aminopeptidase II activity by thyrotropin-releasing hormone and phorbol esters. *Endocrine* 13:267–272
 28. Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH 1986 Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231:159–161
 29. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM 1997 Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138:3359–3368
 30. de Gortari P, Mengod G 2010 Dopamine D1, D2 and mu-opioid receptors are co-expressed with adenylyl cyclase 5 and phosphodiesterase 7B mRNAs in striatal rat cells. *Brain Res* 1310:37–45
 31. Sánchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, 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
 32. Schmitz GG, Walter T, Seibl R, Kessler C 1991 Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal Biochem* 192:222–231
 33. Landry M, Holmberg K, Zhang X, Hökfelt T 2000 Effect of axotomy on expression of NPY, galanin, and NPY Y1 and Y2 receptors in dorsal root ganglia and the superior cervical ganglion studied with double-labeling in situ hybridization and immunohistochemistry. *Exp Neurol* 162:361–384
 34. Fekete C, Kelly J, Mihály E, Sarkar S, Rand WM, Légradí G, Emerson CH, Lechan RM 2001 Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142:2606–2613
 35. Fekete C, Légradí G, Mihály E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, Emerson CH, Lechan RM 2000 α -Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci* 20:1550–1558
 36. Salter-Venzon D, Watts AG 2008 The role of hypothalamic ingestive behavior controllers in generating dehydration anorexia: a Fos mapping study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1009–R1019
 37. Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K, Suzuki M 1988 Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology* 47:384–388
 38. Sherman TG, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Watson SJ 1986 Coordinate expression of hypothalamic pro-dynorphin and pro-vasopressin mRNAs with osmotic stimulation. *Neuroendocrinology* 44:222–228
 39. Meister B, Cortés R, Villar MJ, Schalling M, Hökfelt T 1990 Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260:279–297
 40. Ciosek J, Drobniak J 2004 Vasopressin and oxytocin release and the thyroid function. *J Physiol Pharmacol* 55:423–441
 41. St Germain DL 1994 Iodothyronine deiodinase. *Trends Endocrinol Metab* 5:36–42
 42. Escobar-Morreale HF, Obregón MJ, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G 1995 Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J Clin Invest* 96:2828–2838
 43. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS, Zeöld A, Bianco AC 2008 Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 29:898–938
 44. Kwakkel J, van Beeren HC, Ackermans MT, Platvoet-Ter Schiphorst MC, Fliers E, Wiersinga WM, Boelen A 2009 Skeletal muscle deiodinase type 2 regulation during illness in mice. *J Endocrinol* 203:263–270
 45. Boelen A, Kwakkel J, Vos XG, Wiersinga WM, Fliers E 2006 Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J Endocrinol* 190:537–544
 46. Christoffolete MA, Ribeiro R, Singru P, Fekete C, da Silva WS, Gordon DF, Huang SA, Crescenzi A, Harney JW, Ridgway EC, Larsen PR, Lechan RM, Bianco AC 2006 Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism. *Endocrinology* 147:1735–1743
 47. Koenig RJ 1986 Regulation of thyroxine 5'-deiodinase by thyroid hormones and activators of protein kinase C in GH4C1 cells. *Endocrinology* 118:1491–1497
 48. Kim SW, Harney JW, Larsen PR 1998 Studies of the hormonal regulation of type 2 5'-iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in pituitary tumor cells using semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* 139:4895–4905
 49. Kiyohara K, Tamai H, Takaichi Y, Nakagawa T, Kumagai LF 1989 Decreased thyroidal triiodothyronine secretion in patients with anorexia nervosa: influence of weight recovery. *Am J Clin Nutr* 50:767–772
 50. Lawson EA, Klibanski A 2008 Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4:407–414
 51. Brambilla F, Cocchi D, Nobile P, Müller EE 1981 Anterior pituitary responsiveness to hypothalamic hormones in anorexia nervosa. *Neuropsychobiology* 7:225–237
 52. Krassas GE 2003 Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Pediatr Endocrinol Rev* 1:46–54
 53. Misra M, Klibanski A 2010 Neuroendocrine consequences of anorexia nervosa in adolescents. *Endocr Dev* 17:197–214