



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

LA VÍA DE LA SEROTONINA COMO REGULADORA DE LA EXPRESIÓN DE
TRH DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR EN RATAS CON ANOREXIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Jorge Chávez Jiménez

TUTOR PRINCIPAL:

Dra. De Gortari Gallardo Patricia Bertha Judith

Instituto Nacional De Psiquiatría

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Buijs Rudolf Marinus, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Hernández Cruz Arturo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad Universitaria, CDMX, febrero, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Neurofisiología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz bajo la dirección de la Dra. Patricia de Gortari Gallardo.

El apoyo técnico de este trabajo fue gracias al Biól. Gilberto Trejo Matamoros y a la Tec. Ma. Isabel Amaya Guerrero, del laboratorio de Neurofisiología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por el Dr. Buijs Rudolf Marinus del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y el Dr. Hernández Cruz Arturo del Instituto de Fisiología Celular, División de Neurociencias de la UNAM.

El presente trabajo fue presentado en el 48 Congreso Anual de la Society for Neuroscience en San Diego, CA, EUA, 2019 gracias al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCIÓN	4
4. ANTECEDENTES	5
4.1. El eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides.....	5
4.1.1. Síntesis y regulación de la Hormona Liberadora de Tirotropina	8
4.2. Conducta alimentaria	10
4.2.1. Trastornos de la conducta alimentaria	11
4.2.2. Anorexia y el eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides	12
4.3. La vía de la serotonina.....	15
4.3.1. La serotonina y la Hormona Liberadora de Tirotropina.....	17
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
6. HIPÓTESIS	18
7. OBJETIVOS	19
7.1. OBJETIVO GENERAL	19
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
8. METODOLOGÍA.....	19
8.1. ANIMALES.....	19
8.2. GRUPOS EXPERIMENTALES	20
8.3. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	21
8.4. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA.....	22
8.5. OBTENCIÓN DE TEJIDOS.....	23
8.6. EXTRACCIÓN DE RNA	23
8.7. INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL	24
8.8. RT-PCR EN TIEMPO REAL	24
8.9. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	24
8.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
9. RESULTADOS	25

10. DISCUSIÓN	37
11. CONCLUSIONES.....	41
12. REFERENCIAS.....	42

1. ABREVIATURAS

AgRP	Péptido relacionado al Agouti
ARH	Núcleo Arcuato Hipotalámico
CRH	Hormona Liberadora de Corticotropina
CRH-R2	Receptor 2 a CRH
DIA	Anorexia inducida por deshidratación
DOI	Fármaco agonista de los receptores 5-HT _{2A/2C}
D2	Desyodasa 2
FR	Restricción alimentaria
HL	Hipotálamo lateral
HPT	Eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides
KTN	Ketanserina, fármaco antagonista de los receptores 5-HT _{2A/2C}
MBH	Hipotálamo medio basal
MCT8	Transportador monocarboxilato 8
NPY	Neuropéptido Y
NPY-Y1	Receptor Y1 a NPY
Ox1-R	Receptor 1 a orexinas
PC1 y PC2	Pro-hormonas convertasas
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular hipotalámico
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Hormona estimulante de la tiroides, Tirotropina
T₃	Triyodotironina
T₄	Tiroxina
α-MSH	Hormona estimulante de melanocitos
5-HT	Serotonina

2. RESUMEN

Los animales sometidos a restricción alimentaria (FR) (balance negativo de energía) presentan adaptaciones metabólicas que desaceleran la utilización de energía mediante la reducción de la función del eje hipotálamo hipófisis tiroideas (HPT) [esto incluye: disminución en la expresión de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el núcleo paraventricular (PVN), disminución de la concentración en suero de tirotrópina (TSH) y de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4)]. Los animales con anorexia inducida por deshidratación (DIA), a pesar de presentar similar pérdida de peso que las ratas con FR, no presentan los mismos cambios en el eje tiroideo. Tienen un incremento en la expresión de TRH en el PVN, además en la concentración en suero de TSH con respecto a valores control y al grupo FR; en cambio, sí presentan una disminución en las concentraciones en suero de T_3 y T_4 , similar a lo descrito para los animales con FR.

Diversos factores se han descartado como posibles responsables del incremento del TRH en el PVN de roedores con DIA, y otros identificados no han sido capaces de revertir por completo su expresión a valores basales. Por lo tanto, es factible que existan otros péptidos o neurotransmisores involucrados, como la vía de la serotonina (5-HT), en la regulación de la expresión de TRH en este modelo. De hecho, los receptores a serotonina (5-HT₁ y 5-HT₂) se expresan en el PVN del hipotálamo y su activación induce anorexia en ratas naïve, así como en aquellas que han recibido la inyección de un factor orexigénico, como NPY.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue definir la participación de la vía de 5-HT del PVN en los cambios de expresión de TRH de ratas con anorexia. Para ello, se administró en el PVN de ratas con FR y con DIA un agonista de los receptores 5-HT_{2A}/5-HT_{2C}, DOI y un antagonista de los mismos receptores, ketanserina (KTN), respectivamente, siempre comparando contra un grupo control con alimentación *ad libitum*. Además de la expresión de TRH del PVN, también se evaluó el cambio en las concentraciones en suero de TSH, T_3 y T_4 , y en la conducta alimentaria de ambos grupos de ratas.

Los resultados mostraron que la administración de DOI en ratas con FR indujo un incremento en la expresión de TRH del PVN, en cambio, no se observó diferencia significativa en la concentración en suero de TSH en dicho grupo; de manera interesante, la administración de DOI incrementó la concentración en suero de T₃, sin cambios en la de T₄ en las ratas con FR. Por otro lado, la administración de KTN en ratas con DIA no indujo cambios en la expresión de TRH del PVN, ni en las concentraciones en suero de TSH, T₃ y T₄. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la conducta alimentaria de las ratas con DIA tras la administración de ketanserina, pero al administrar DOI en los animales con FR incrementa el consumo de alimentos significativamente, indicando el papel anorexigénico de la 5-HT.

Por lo tanto, se concluye que la activación de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} incrementa la expresión de TRH del PVN en ratas y la concentración en suero de T₃ revirtiendo su disminución inducida por FR. Por otro lado, la vía de serotonina sí participa en la disminuida expresión de TRH del PVN en ratas con FR, Además, el bloqueo farmacológico de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} no revierte la sobreexpresión de TRH que se observa en ratas con DIA. Se demostró el papel anorexigénico de la serotonina en el PVN de ratas con FR. Finalmente, no se demostró el papel anorexigénico de la serotonina en el PVN de ratas con DIA.

3. INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de tirotrópica (TRH) sintetizada en las neuronas hipofisiotrópicas del núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico regula la síntesis y secreción de la tirotrópica (TSH) en la adenohipófisis, quien a su vez controla la función tiroidea, actuando sobre sus receptores en la glándula tiroides e induciendo la liberación de triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4). T_3 es la hormona tiroidea activa y es capaz de estimular la oxidación de las reservas energéticas en sus órganos blanco como los adipocitos y el músculo esquelético [1]. Es por esto que el eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides (HPT) juega un papel importante en la homeostasis energética y de acuerdo al estatus energético, este va a exhibir diferentes cambios [2].

En la restricción alimentaria (FR), por ejemplo, dado que se presenta un balance negativo de energía, se induce una adaptación del eje tiroideo, observándose una disminución en la actividad de este, con la finalidad de disminuir el gasto energético [3].

La anorexia nerviosa es un trastorno del comportamiento que se caracteriza por la distorsión de la imagen corporal y el rechazo a comer, a pesar de la reducción dramática del peso corporal o desnutrición y por ende, cambios en la homeostasis energética [2, 4].

Existen diversos modelos en animales para el estudio de la anorexia, uno de ellos es el modelo de anorexia inducida por deshidratación (DIA); en este se presentan diferencias en la actividad del eje HPT al comparar con animales con FR (quienes consumen la cantidad de alimento ingerido por las ratas con DIA), tales como aumento en la expresión de TRH en el PVN e incremento en la concentración en suero de TSH [5].

En cambio, la expresión de neuropéptidos de otros núcleos hipotalámicos como el núcleo arcuato hipotalámico (ARH), implicados en el consumo de alimentos (orexigénicos y anorexigénicos), es similar en ambos grupos de animales con balance negativo de energía. Así que, aunque péptidos como neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado al agouti (AgRP) del ARH son liberados hacia el

PVN y son capaces de regular la expresión de TRH y la actividad del eje HPT [6], se han descartado como posibles factores involucrados en la inadecuada adaptación del eje en las ratas DIA a su disminuido peso y consumo de alimentos [7, 8].

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es un neurotransmisor implicado en procesos fisiológicos como la termorregulación, locomoción, dolor, reproducción, memoria y aprendizaje, respuesta al estrés, estado anímico y conducta alimentaria, entre otros [9]. En cuanto a la conducta alimentaria, la 5-HT inyectada en el PVN actúa como anorexigénico, sugiriendo que el PVN modula la saciedad inducida por la 5-HT endógena [10], sin embargo, se desconoce si la vía de la 5-HT está implicada en la regulación de la expresión de TRH en el PVN de ratas con DIA.

El estudio de los mecanismo mencionados permitirá entender mejor la neurofisiología de la conducta alimentaria y en un futuro diseñar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de los trastornos de la conducta alimentaria.

4. ANTECEDENTES

4.1. El eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides

El eje HPT comprende la síntesis de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo, la cual estimula la hipófisis para la síntesis y liberación de TSH. La TSH estimula la glándula tiroides para secretar la pro-hormona tiroxina (T_4), la cual es convertida a triyodotironina (T_3) por acción de las yodotironina desyodasas (D_1 , D_2 y D_3); las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) son transportadas a través de la membrana celular por transportadores específicos como el transportador monocarboxilato 8 (MCT8); dentro de las células blanco, T_3 puede interactuar con receptores nucleares a hormonas tiroideas y activar o inactivar la expresión de genes [11]. Las hormonas tiroideas regulan negativamente el eje a nivel del hipotálamo y la hipófisis inhibiendo la síntesis de TRH y TSH, respectivamente **(figura 1)** [2].

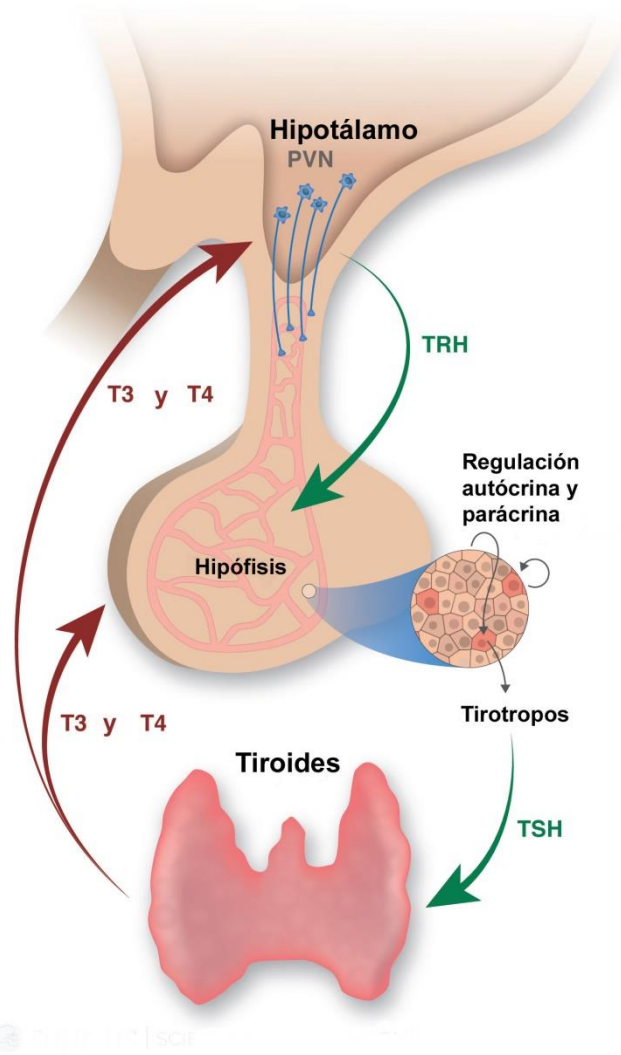


Figura 1. Regulación del eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides. El núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) sintetiza y libera la hormona liberadora de tirotrópica (TRH), quien estimula a la hipófisis para la síntesis y liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, tirotrópica), quien a su vez estimula a la glándula tiroides e induce la liberación de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4); las hormonas tiroideas modulan al eje por retroalimentación negativa a nivel de la hipófisis y el hipotálamo. Modificado de [1].

T_3 y T_4 son esenciales para llevar a cabo diferentes procesos biológicos tales como el desarrollo cerebral, regulación de la función cardiovascular y hepática, además activan la tasa del metabolismo y por tanto regulan el balance energético, y en función de éste, la conducta alimentaria [12]. Así, dependiendo del balance energético, el eje HPT se regula diferencialmente; en un estado de ayuno o restricción alimentaria, el eje HPT se regula negativamente como una respuesta adaptativa para disminuir el gasto de energía durante la privación de alimento [13]

La función endócrina de TRH es principalmente regulada por el receptor TRH-R1 [14], sin embargo, dado que se expresa también el receptor TRH-R2 a lo largo del sistema nervioso central [15], los efectos de TRH en el mismo son amplios; de acuerdo a esto se ha reportado que la administración intracerebroventricular (i.c.v) de TRH induce un efecto ansiolítico en ratas [16, 17]. Interesantemente, TRH disminuye la concentración en suero de corticosterona, apoyando la idea de su efecto ansiolítico en las ratas [18]. Además, TRH modula las funciones cognitivas superiores y el estado de ánimo ejerciendo funciones antidepresivas [18-20]. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que TRH actúa como un péptido anorexigénico cuando es administrado i.c.v. y subcutáneamente [21-23] y cuando es administrado en el núcleo accumbens reduce la motivación por ingerir alimentos (**Figura 2**) [24].

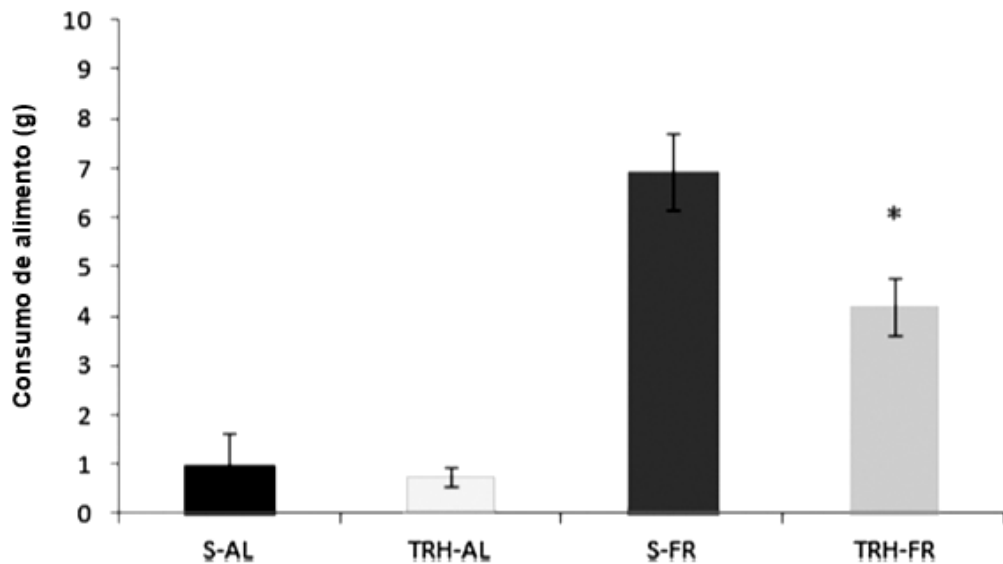


Figura 2. La administración de TRH en el núcleo accumbens disminuye la motivación por ingerir alimentos. S: administrados con solución salina, AL: alimentación ad libitum, FR: Restricción alimentaria, TRH: administrados con TRH. EEM, n=8 por grupo. Modificado de [24].

4.1.1. Síntesis y regulación de la Hormona Liberadora de Tirotropina

La TRH se sintetiza en varios tejidos, tales como las células β del páncreas, las células C de la glándula tiroides, el miocardio, los órganos reproductivos incluyendo la próstata y los testículos, la médula espinal, la pituitaria anterior y diversas regiones cerebrales, pero únicamente la TRH que se sintetiza en las neuronas hipofisiotrópicas localizadas en el PVN hipotalámico regula la actividad del eje HPT [2, 12].

El PVN consta de tres regiones, la anterior (PVNa), la medial (PVNm) y la caudal (PVNc) y está compuesto por neuronas magnocelulares y parvocelulares. Las neuronas parvocelulares proyectan sus axones hacia la eminencia media [25]. A su vez, la división parvocelular se subdivide en: anterior, periventricular, medial, ventral, dorsal y lateral; todas ellas sintetizan TRH, sin embargo, las neuronas TRH-érgicas hipofisiotrópicas (que regulan la función del eje HPT) se encuentran localizadas únicamente en las subdivisiones medial y periventricular del PVNm y PVNc en ratas (**Figura 3**) [12].

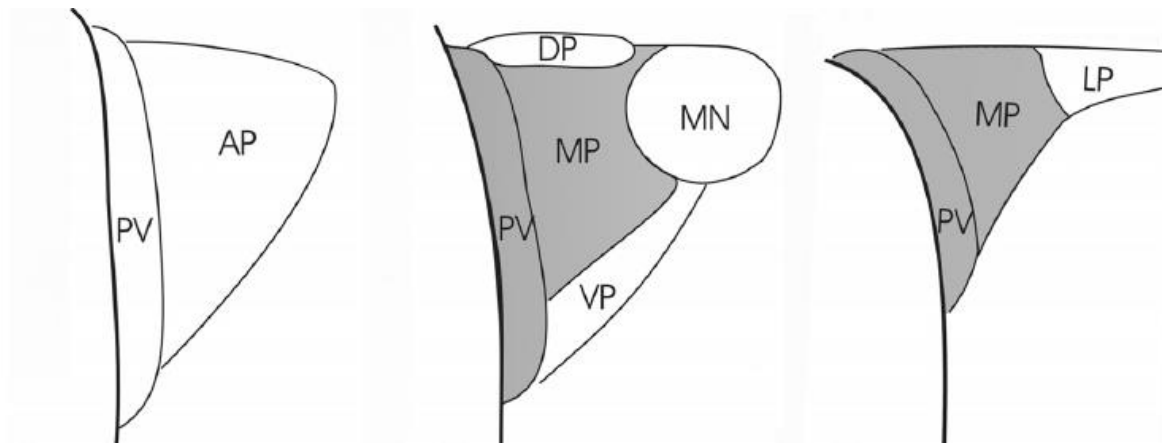


Figura 3. Neuronas parvocelulares del PVN en ratas. Las regiones sombreadas pertenecen a las subdivisiones periventricular (PV) y medial (MP), quienes sintetizan TRH con acción hipofisiotrópica. [12].

La TRH es un tripéptido (pGlu-His-ProNH₂) que se sintetiza como una proteína precursora larga (pre-pro-TRH) que se procesa a pro-TRH y finalmente a TRH por las prohormonas convertasas (PC1 y PC2) [2, 12]. El gen de la TRH de ratas y de humanos contiene 3 exones y 2 intrones; el exón 1 codifica para la región 5' no traducida, mientras que los exones 2 y 3 contienen la secuencia que codifica para la pre-pro-TRH [26]. La T₃, proveniente de la circulación, o de los tanicitos (células gliales especializadas, quienes expresan la D₂ [12]), regula negativamente la expresión de pre-pro-TRH, uniéndose al receptor a hormonas tiroideas (TRβ2) de modo que el complejo receptor-hormona se une a elementos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE, también llamados "sitio 4") localizados en el gen de la pre-pro-TRH, inhibiendo así su transcripción (**Figura 4**) [12, 26].

La expresión de TRH del PVN puede ser modificada por hormonas periféricas como la leptina que se sintetiza y libera del tejido adiposo y cuyos efectos anorexigénicos están bien descritos. Los efectos de la leptina sobre TRH son estimuladores y pueden ser indirectos, tras inhibir la expresión de neuropéptido Y (NPY) o por estimulación de las neuronas de proopiomelanocortinas (POMC) y de la hormona estimulante de melanocitos (α-MSH) en el ARH. Una consecuente disminución o aumento de la secreción de NPY y α-MSH respectivamente hacia el PVN, inducen la expresión de TRH; la vía directa de acción de la leptina sobre la síntesis de TRH es por la activación de su receptor Ob-Rb en las células TRHérgicas del PVN, que resulta en la fosforilación de STAT3 (**Figura 4**) [26].

La inactivación de la TRH liberada en el cerebro y en la sangre portal hipofisiaria, es catalizada por la ectoenzima embebida a la membrana celular, la piroglutamil peptidasa II (PPII), quien escinde a TRH, resultando en el dipéptido His-ProNH₂, este dipéptido es degradado por la dipeptidil aminopeptidasa IV o se cicliza a His-Pro dicetopiperazina [27].

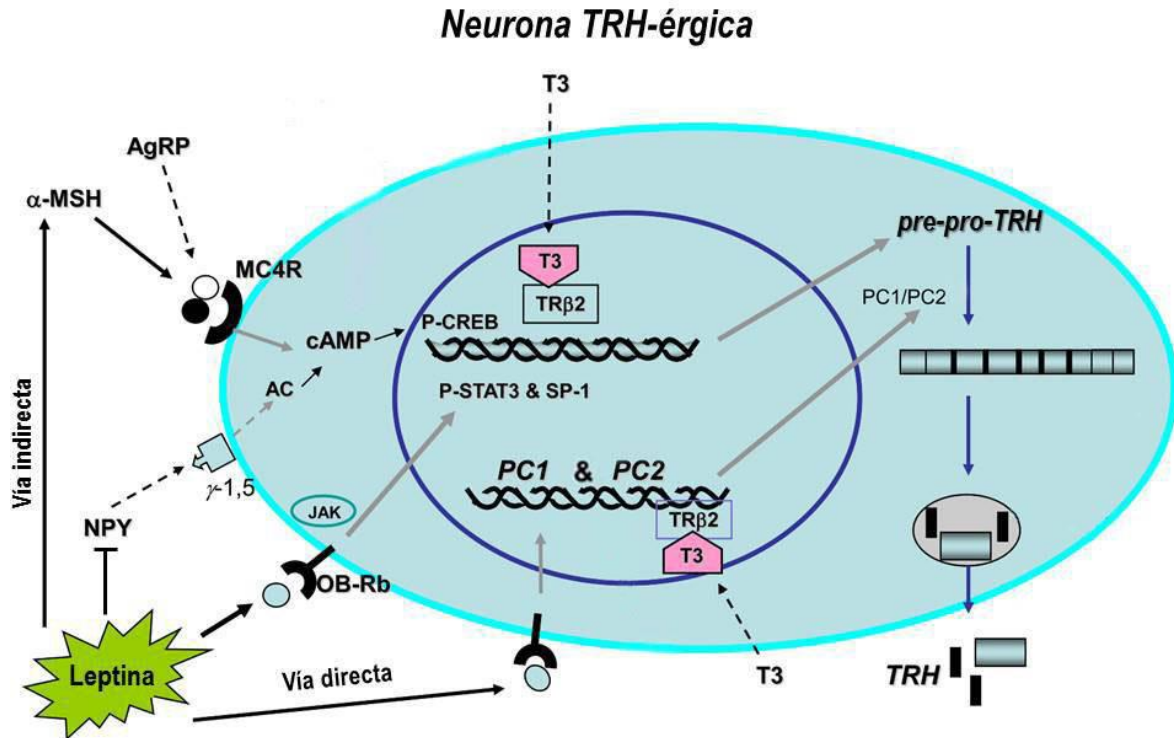


Figura 4. Síntesis y regulación de TRH. La síntesis de TRH es mediada por diferentes factores, tales como la leptina, el neuropéptido Y (NPY), α -MSH, AgRP y T_3 . Una vez sintetizada la pre-pro-TRH, es procesada por las prohormonas convertasas (PC1/PC2). Modificado de [26]

4.2. Conducta alimentaria

La conducta alimentaria es la interacción compleja de factores fisiológicos, psicológicos, sociales y genéticos que influyen en la cantidad de alimento ingerido y la preferencia y selección de los mismos, además de la hora en la que se consumen [28]. A grandes rasgos, los diversos factores que intervienen en los procesos de la conducta alimentaria se pueden clasificar en señales externas (detectadas por los diversos sentidos) y señales internas (estado nutricional y hormonas); estos dos tipos de señales son integrados en 2 grandes sistemas: el sistema homeostático, capaz de detectar las necesidades energéticas, y el sistema hedónico, quien regula el placer (gusto) y el querer (motivación) los alimentos, lo que resulta en la acción de ingerir o dejar de ingerir los alimentos (**Figura 5**) [29].

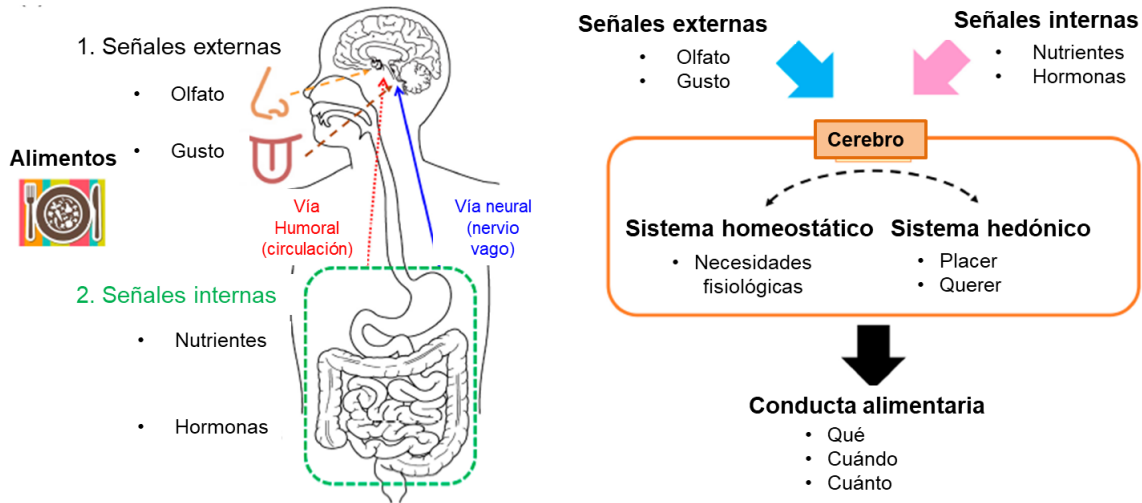


Figura 5. Señales que intervienen en la conducta alimentaria. Las señales internas y externas se integran en los sistemas homeostático y hedónico para llevar a cabo la acción de ingerir o dejar de ingerir alimentos. Modificado de [29].

4.2.1. Trastornos de la conducta alimentaria

A pesar de que los trastornos de la conducta alimentaria a menudo son considerados como una forma de vida, estos generan graves enfermedades a las personas que los padecen. Los trastornos de la conducta alimentaria se caracterizan por presentar obsesiones con los alimentos, el peso y la forma corporal y los más comunes son la anorexia nerviosa, la bulimia nerviosa y el trastorno por atracón [30].

Los trastornos de la conducta alimentaria están influenciados por distintos factores, tanto psicológicos, fisiológicos y sociales (como la interacción familiar y laboral); estos influyen de manera diferente dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el individuo [31, 32].

La anorexia nerviosa se caracteriza por la distorsión de la imagen corporal y el rechazo a comer, el paciente presenta bajo peso y desnutrición y por ende, cambios en la homeostasis energética [2, 4].

Es importante mencionar que datos de la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos revelan que existe una mayor prevalencia de la anorexia en mujeres que en hombres en una relación de 2:1, en un estudio epidemiológico del 2016 en todos los estados del país.

En general, los trastornos de la conducta alimentaria conllevan a cambios importantes en la regulación del balance energético a nivel del eje HPT a través de variaciones en la expresión de diferentes neuropéptidos que regulan la expresión de TRH [2]. Además, se encuentran cambios en los diferentes sistemas neuroendócrinos y neuroquímicos en general, tales como los sistemas adrenal y gonadal y los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos, entre otros. Por ejemplo, se ha encontrado que los pacientes con bulimia tienen incrementada la concentración en plasma de β -endorfina, decremento en la concentración en suero de norepinefrina y decremento en la concentración de ácido homovanílico (metabolito de dopamina) en el líquido cefalorraquídeo [33].

Una enfermedad no precisamente de la conducta alimentaria, pero que conlleva a cambios importantes en el balance energético es el Síndrome del enfermo eutiroideo, en donde el paciente presenta valores anormales de las hormonas tiroideas pero sin antecedentes de enfermedad tiroidea, por lo general se encuentran valores bajos de T_3 y valores normales de TSH, esto puede inducir cambios en el control metabólico y por lo tanto alteraciones en el estado nutricional [34].

4.2.2. Anorexia y el eje Hipotálamo Hipófisis Tiroides

El modelo de DIA es un modelo para el estudio de la anorexia; los animales presentan una adaptación fisiológica que limita el consumo de alimentos tras la ingesta de una solución salina hipertónica (NaCl 2.5%). Este modelo permite examinar las redes neuronales y la regulación de las vías de los diferentes neuropéptidos, ya que el desarrollo de la anorexia es lento y se revierte rápidamente una vez que los animales ingieren agua sola nuevamente [6].

Los animales con DIA presentan cambios en la regulación del eje HPT cuando son comparados contra los del grupo control (con alimentación *ad libitum*) y del grupo de animales con FR. En los animales con DIA (después de 5 días) se observa un aumento en la expresión de TRH en el PVN además de un aumento en la concentración en suero de TSH, en comparación con los animales FR (quienes consumen la cantidad ingerida por los animales con DIA), los cuales presentan una disminución en la expresión de TRH en el PVN y disminución en la concentración en suero de TSH [5].

Las acciones inhibitorias de NPY (orexigénico) y estimuladoras de α -MSH (anorexigénico) sobre la expresión de TRH del NPV, lo han postulado como un inhibidor de la conducta alimentaria [35].

Como se mencionó anteriormente, la expresión de TRH del PVN puede ser modificada por diferentes estímulos, así, la concentración en suero de leptina que disminuye en animales con balance negativo de energía (FR o DIA) [5], es una señal que reduce la expresión de TRH en la restricción alimentaria, sin embargo en las ratas DIA esto no ocurre; estos resultados demuestran que la incrementada expresión de TRH en el PVN y de la concentración de TSH en suero de animales con anorexia por deshidratación es independiente de la reducida leptina circulante.

Otra hormona circulatoria cuya concentración se incrementa en el balance negativo de energía es la corticosterona, dado que el ayuno o la restricción de alimentos y la pérdida dramática de peso representan una situación de estrés para los individuos. Así, la concentración en suero de corticosterona está incrementada también en los animales con DIA [5]. Las condiciones metabólicas entonces son similares entre los dos grupos. La disminución de los niveles de leptina aunada al incremento de corticosterona inducen la expresión y actividad de la enzima desyodasa-2 (D2) en el hipotálamo medio basal (MBH) [36], quien cataliza la conversión de T_4 en T_3 , de modo que en ratas con FR aumenta la concentración de T_3 en el NPV y esto se cree que es el factor que inhibe la expresión de TRH en el PVN de estos animales [5]. Dado que las ratas con DIA presentan el incremento en la actividad de D2 en el PVN pero no la disminución de TRH esperada, se ha estudiado la expresión del transportador de hormonas tiroideas, el MCT8. Los

resultados muestran menor expresión en el MBH y en PVNc de ratas anoréxicas [37], lo que sugiere que estos animales presentan una disminución en la entrada de la T_3 en el PVNc y por ende, un aumento en la expresión de la TRH. Estos resultados indican que la alteración en la expresión del MCT8 en los animales con DIA contribuye parcialmente a la actividad del eje HPT y a la mayor síntesis de TRH en el PVN.

Otro péptido que se ha descartado como responsable de la falta de adaptación del HPT y de la mayor expresión de TRH del PVN de ratas con anorexia, es la pre-pro-orexina del hipotálamo lateral (LH) ya que su contenido de RNAm no cambia en comparación con los animales con FR (en los que sí aumentan) [7].

A pesar de que la deshidratación activa las células vasopresinérgicas del PVN, la concentración en suero de la AVP también es similar entre los grupos de DIA y FR, lo que ha permitido descartarla como involucrada en la mayor liberación de TSH en los animales con anorexia [8, 38].

En cambio, al analizar la expresión de los receptores en el PVN de los péptidos mencionados se ha observado mayor contenido del RNAm del receptor a orexinas (Ox1-R) en los animales con DIA como consecuencia de la liberación inhibida de orexinas [7]. En cuanto a los receptores a NPY, se ha reportado una expresión diferencial de NPY-Y1 en el PVN, donde el mRNA de este es menor en los animales con FR con respecto a los animales con DIA, sugiriendo que su activación mediada por NPY mantiene su actividad inhibitoria sobre la expresión de TRH [7].

Todos estos resultados sugieren que las neuronas del ARH son capaces de responder a los cambios periféricos en ratas con anorexia, mientras que las del HL y del PVN parecen ser las afectadas.

Aún más, las neuronas que sintetizan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el HL, que tiene efectos anorexigénicos están activadas en ratas con DIA [39]; interesantemente el receptor que media sus efectos inhibidores del apetito de CRH (CRH-R2) [40-42] en el PVN tiene su síntesis incrementada en ratas con anorexia y su bloqueo con un antagonista específico a CRH-R2 en ratas

DIA atenúa su comportamiento anoréxico, lo que correlaciona con una disminución en la expresión de TRH en ese núcleo hipotalámico. Esto sugiere que la activación del eje HPT inducida por DIA se ve afectada por la expresión diferencial de la CRH del HL y sus efectos sobre CRH-R2 a nivel del PVN [43].

Sin embargo, el hecho de que no se haya encontrado ningún factor que sea capaz de evitar el incremento de TRH del PVN o de revertirlo, apoya la participación de varios en esta falta de adaptación neuroendócrina a la pérdida de peso de las ratas con anorexia. Dado que es en el PVN (o en el HL) donde se han identificado factores participantes, se considera relevante la búsqueda de otra vía neuronal conocida por sus efectos anorexigénicos de este núcleo, como responsable de los cambios en la expresión de TRH y la inhibición de la conducta alimentaria.

4.3. La vía de la serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) es una indolamina que regula diversos procesos fisiológicos como la temperatura, locomoción, dolor, reproducción, memoria y aprendizaje, respuesta al estrés, estado anímico y conducta alimentaria, además de participar en procesos patológicos como la depresión, ansiedad, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, trastorno obsesivo compulsivo, anorexia, entre otros [9].

La 5-HT en el cerebro se sintetiza en 9 núcleos serotoninérgicos, de los cuales 8 de ellos se encuentran localizados en el núcleo del rafe y 1 en la sustancia nigra; sus axones proyectan a diferentes áreas cerebrales incluyendo el hipotálamo **(Figura 6)** [44].

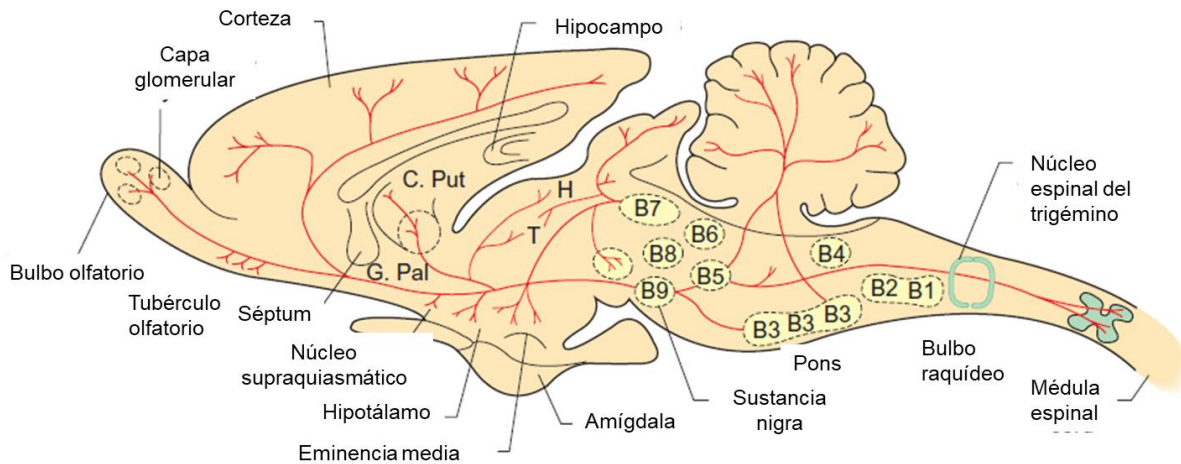


Figura 6. Núcleos cerebrales que sintetizan serotonina y las proyecciones axonales que tienen. C.Put: núcleo caudado-putamen, H: habénula, G. Pal: globo pálido, T: tálamo. Editado de [44].

Se han descrito 7 familias de receptores a serotonina (5-HT₁ – 5-HT₇), las cuales se dividen en diferentes subtipos y cada uno ejerce diferentes funciones de acuerdo al tejido donde se expresen [45].

Los receptores a serotonina implicados en la conducta alimentaria son los 5-HT₁ (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}) y los 5-HT₂ (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}) [46]. De estos receptores, se han identificado en el PVN a 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} [47]. Interesantemente, la 5-HT administrada en el PVN actúa como señal anorexigénica, sugiriendo que el PVN modula la saciedad inducida por la 5-HT endógena [10].

La inyección de agonistas a receptores de serotonina, como el DOI, se ha realizado directamente en el PVN de ratas alimentadas *ad libitum*, o bien después de ser administradas con NPY o norepinefrina, las cuales tienen acciones estimuladoras del apetito, o bien tras un ayuno de más de 10 horas. Los agonistas a 5-HT_{1A}, como ipsapirona, pueden tener efectos hiperfágicos cuando se analiza el consumo de alimentos a las 4 h, lo que se ha relacionado con su localización somatodendrítica en neuronas serotoninérgicas del núcleo rafe. Sin embargo, dependiendo de la dosis y del tiempo en el que se evalúa la conducta alimentaria, agonistas como el DOI (agonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}) tienen efectos anorexigénicos cuando se inyectan intraperitonealmente (1.0 – 10 mg/kg) o bien en el PVN (1.8 – 7.1 µg); también se ha visto el efecto en animales con inyección

de NPY, y en aquellos con ayuno de 20 h y acceso por una hora a los alimentos en la realimentación [46].

Es importante mencionar que no se han sido inyectado agonistas a los receptores 5-HT_{1B} directamente en el PVN.

Se ha encontrado una posible contribución diferencial de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} dependiendo de la vía de administración del (los) agonista (s); así, la administración sistémica de DOI puede interferir con la vía homeostática de la alimentación más que con la parte conductual. Esto es porque de manera sistémica el DOI activa básicamente a receptores 5-HT_{2A}, mientras que en el hipotálamo a los 5-HT_{2C}, los cuales se han implicado en la regulación de la frecuencia de consumo más que en el volumen de alimento; esto se ha estudiado administrando el antagonista a los mismos receptores, la ketanserina [46]. De acuerdo a esto, es importante que la administración de DOI se realice directamente en el PVN.

Finalmente, los ratones KO para 5HT_{2C} incrementan el consumo de alimentos y por lo tanto desarrollan hiperfagia [48-50].

4.3.1. La serotonina y la Hormona Liberadora de Tirotrópina

Se han realizado solo pocos estudios que intentan demostrar si existe una posible relación entre la vía de la serotonina y TRH, sin embargo, los resultados son ambiguos.

Se ha sugerido que la TRH potencia los efectos antidepresivos de la imipramina (inhibidor de la recaptura de serotonina) en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el hipotálamo [51]. Por otro lado, el análogo de TRH, MK-771, administrado intraperitonealmente, incrementa los niveles de 5-HT y su metabolito (ácido 5-hidroxiindolacético, 5-HIAA) en el mesencéfalo, hipocampo e hipotálamo [52]

Sin embargo, otro grupo de investigación sugiere que solamente la administración a altas dosis de TRH incrementa los niveles de 5-HT en el hipotálamo y mesencéfalo, no observando cambios a bajas dosis de TRH [53].

Finalmente, la 5-HT estimula la síntesis de TRH en cardiomiocitos de embriones de rata [54].

El hecho de que la estimulación de la vía serotoninérgica del PVN tenga efecto no solo en la conducta alimentaria, sino también en que aumenta el metabolismo energético activándose la oxidación de lípidos, sugiere que puede estar involucrada en aumentar la expresión de TRH, quien coordina ambos procesos [48].

Aún más, la estimulación de la vía serotoninérgica, administrándola directamente o administrando fármacos que estimulan su liberación, eleva la concentración en sangre de corticosterona, parámetro similarmente modificado en las ratas DIA [48].

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los animales con DIA presentan mayor expresión de TRH en el PVN y mayor concentración en suero de TSH en comparación con el grupo control y el grupo FR. Además, la 5-HT actúa como señal anorexigénica cuando es administrada en el PVN, el cual tiene expresión de receptores a 5-HT involucrados en la conducta alimentaria. Sin embargo, se desconoce si la vía de la 5-HT está implicada en la regulación de la expresión de TRH en el PVN de ratas con DIA.

6. HIPÓTESIS

Si la 5-HT está participando en la mayor expresión de TRH del PVN de ratas DIA y en la elevación de la concentración en suero de TSH, entonces la administración en dicho núcleo de un agonista del receptor a 5-HT en ratas con FR inducirá activación de la expresión de TRH y la administración de un antagonista del receptor a 5-HT en ratas con DIA inducirá inhibición en la expresión de TRH, que se asociarán inversamente con la conducta de anorexia en un modelo animal.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de la vía de la serotonina en la regulación de la expresión de TRH en el PVN de ratas con DIA y FR.

7.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto del DOI, agonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, administrado en el PVN en la conducta alimentaria y en los niveles de mRNA TRH en el PVN y en las concentraciones en suero de TSH y T₃ y T₄ de animales con FR.
- Determinar el efecto de la ketanserina administrada en el PVN en la conducta alimentaria y en los niveles de mRNA TRH en el PVN y en las concentraciones en suero de TSH y T₃ y T₄ de animales con DIA.

8. METODOLOGÍA

8.1. ANIMALES

Se utilizaron ratas Wistar hembras (dada la prevalencia de la anorexia en mujeres) de 250 g de peso procedentes del Instituto Nacional de Psiquiatría y mantenidas en condiciones controladas y separadas en cajas individuales con ciclos de 12 horas luz/oscuridad a 25° C, con humedad constante y con alimento chow y agua *ad libitum* hasta la realización del experimento.

Las dietas y tratamientos fueron aprobados por el comité de ética del Instituto Nacional de Psiquiatría.

Los animales fueron manipulados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8.2. GRUPOS EXPERIMENTALES

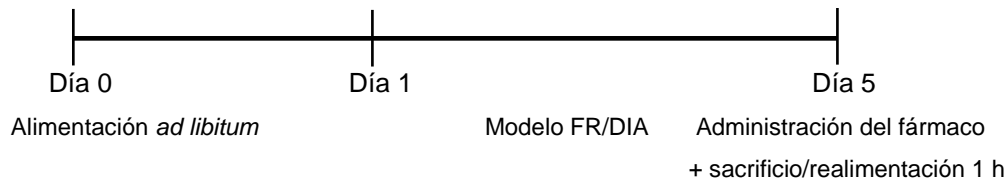
- Grupo control: Ratas alimentadas *ad libitum* durante 5 días sin administrar fármacos o vehículo.
- Grupo FR + vehículo: Ratas con inducción de hambre por FR durante 5 días administradas (en el día 5) en el PVN con 0.5 µl del vehículo (solución salina estéril).
- Grupo FR + DOI: Ratas con inducción de hambre por FR durante 5 días administradas (en el día 5) en el PVN con 0.5 µl de DOI 15 nmol.
- Grupo DIA + vehículo: Ratas con anorexia inducida por deshidratación por 5 días administradas (en el día 5) en el PVN con 0.5 µl del vehículo (solución salina estéril).
- Grupo DIA + ketanserina: Ratas con anorexia inducida por deshidratación por 5 días administradas (en el día 5) en el PVN con 0.5 µl de ketanserina 30 nmol.

Se cuantificó el consumo de alimentos por diferencia de peso entre lo que se colocó y lo que restó al día siguiente; se tomó el peso corporal de las ratas durante los 5 días y se registró el peso basal con la finalidad de tener un registro y control para su respectivo análisis. A las ratas con FR se les proporcionó la cantidad de alimento que ingirieron las ratas con DIA un día anterior.

Para la evaluación de la respuesta del eje tiroideo se utilizaron de 3 a 9 ratas por grupo y fueron sacrificadas 30 min después de la administración del fármaco y para la evaluación de la conducta alimentaria se utilizaron de 5 a 8 ratas por grupo y se realimentaron durante 1 h *ad libitum* y se cuantificó el consumo de alimento.

Las dosis fueron seleccionadas de acuerdo a previos estudios en donde se demuestra el efecto en la conducta alimentaria de DOI y de ketanserina administrados en el PVN [55].

Esquema experimental:



8.3. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Para la administración del o los fármacos, las ratas fueron sometidas a cirugía estereotáxica mediante la cual se le insertó una cánula en el PVN que permitió la administración del respectivo fármaco.

Para ello, las ratas fueron anestesiadas intramuscularmente con ketamina (73 UI/kg) y xilacina (60 UI/kg). Una vez que la anestesia surtió efecto, las ratas fueron fijadas en el equipo estereotáxico y se les realizó una incisión para poder realizar el trépano donde fue colocada la cánula de acuerdo a las siguientes coordenadas tomando como punto de referencia el Bregma:

Anterior/Posterior (A/P)= -1.6 mm,

Medio/Lateral (M/L)= +0.3 mm y

Dorso/Ventral (D/V)= -7.5 mm.

Una vez colocada la cánula, se fijó con cemento acrílico y se realizó la sutura (**Figura 7**).

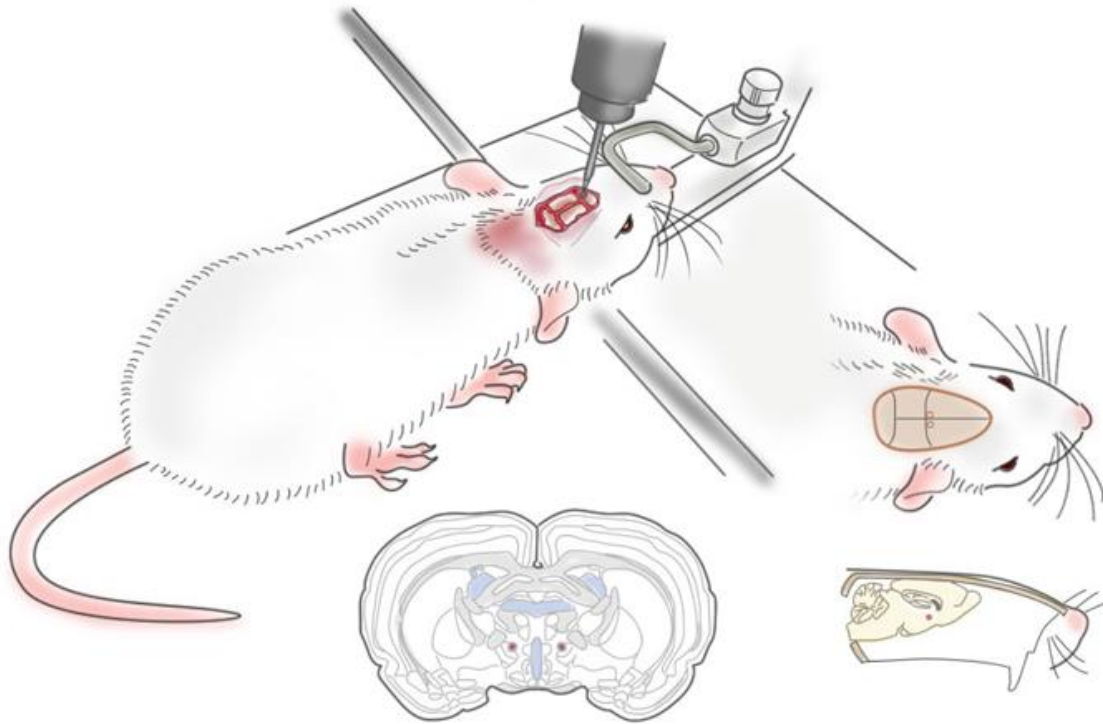


Figura 7. Representación de la cirugía estereotáxica. La rata es anestesiada y colocada en el equipo estereotáxico para posteriormente realizar el trépano en las coordenadas adecuadas en relación al bregma.

Los animales se mantuvieron a las condiciones mencionadas en el punto 8.1 para su recuperación (4 días).

Luego de su recuperación, los animales se sometieron a las condiciones mencionadas en el punto 8.2.

8.4. EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA

Los animales fueron administrados con el respectivo fármaco (DOI para los animales con FR y ketanserina para los animales con DIA) a las 18:30 h y a las 19:00 h fueron realimentadas *ad libitum* durante 1 hora; la cantidad de alimento ingerido fue cuantificado.

8.5. OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Para la evaluación del eje HPT, los animales se decapitaron a los 30 min de la administración del fármaco y se extrajo el cerebro y la sangre troncal. Para la evaluación de la conducta alimentaria, los animales se decapitaron posterior a la hora de realimentación y se extrajo el cerebro y la sangre troncal. El suero fue obtenido mediante centrifugación de la sangre a 3000 rpm durante 30 min. Tanto el cerebro, como el suero se almacenaron a -70 °C hasta el momento de su análisis. Para el análisis, se extrajo el PVN de los cerebros utilizando un *punch* y hielo seco.

8.6. EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción de RNA del PVN se realizó utilizando 100 µl de solución D (4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio, 0.5% de sarcosil pH 7 y 0.1 M de β-mercaptoetanol), las muestras se disolvieron utilizando ultrasonido.

Se adicionaron 100 µl de fenol saturado en agua con DEPC, 10 µl de acetato de sodio y 30 µl de cloroformo isoamílico. Se dejó reposar por 20 min a -4°C. Se centrifugó a 10,000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionaron 100 µl de isopropanol al 100%, la muestra se incubó por 24 h a -20 °C y se centrifugó a 13,800 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se lavó 2 veces la pellet de RNA con 300 µl de etanol al 75%, se agitó suavemente y se centrifugó a 13,800 rpm durante 12 minutos a 4°C después de cada lavado. El RNA se secó por centrifugación al vacío por 5 min.

Para la cuantificación de RNA se adicionaron 10 µl de H₂O/DEPC (dietilpirocarbonato) y se leyó en un espectrofotómetro (Eppendorf, Biofotometer) a 460 nm. Para analizar la calidad del RNA, se consideró que la relación 260/280 fuera mayor a 1.5.

8.7. INTEGRIDAD DEL RNA TOTAL

La integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando bromuro de etidio como marcador. El gel se corrió a 50 V por 1 h. La densidad de las bandas se analizó con el transiluminador UV y el programa Advanced American Biotechnology Imaging 2D (CA, EUA).

8.8. RT-PCR EN TIEMPO REAL

Se utilizaron 1.5 µg de RNA, 500 ng de oligos-dT y 100 U de M-MLV transcriptasa reversa (Invitrogen) para la síntesis del cDNA. Para la cuantificación de pro-TRH se utilizó el *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) en un sistema de PCR en tiempo real 7500. Los oligonucleótidos (primers) fueron Rn00564880_m1 (Applied Biosystems). Los datos obtenidos fueron normalizados tomando como control la expresión de β-actina.

8.9. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

La determinación de las concentraciones en suero de T₃ y T₄ en suero se realizaron con el estuche comercial de inmunoensayo BIOVISION® Total Triiodothyronine T₃ y T₄ ELISA, respectivamente.

Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 10 ng/ml. Por otro lado, se agregó directamente en el fondo 50 µL de los controles y muestras y después 50 µl del anticuerpo de T₃ y T₄, respectivamente y se mezcló durante 30 s. Se agregaron 100 µl del conjugado de trabajo y se mezcló durante 30 s. Posteriormente, se dejó incubar la placa durante 60 min a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos 5 veces con agua desionizada con la finalidad de remover todos los residuos de agua. Se agregaron 100 µl de TMB en cada pozo, se mezcló durante 5 s y se incubaron en oscuridad

por 20 min. Se agregaron 100 μ l de la solución *Stop* a cada pozo, se mezcló durante 30 s y se leyó la placa a una absorbancia de 450 nm.

La determinación de la concentración en suero de TSH en suero se llevó a cabo con el estuche comercial de inmunoensayo ALPCO® Thyroid Stimulating Hormone (Rat) ELISA.

Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 80 ng/ml. Por otro lado, se agregaron directamente 25 μ l de los controles y muestras y después 200 μ l del anticuerpo de TSH y se dejó incubar por 20 h. Luego, se hicieron 4 lavados con 300 μ l del buffer de lavado. Posteriormente se agregaron 200 μ l de la solución TMB a cada pozo; se dejó incubar por 30 min y finalmente, se añadieron 50 μ l de la solución *Stop* a cada pozo. La lectura se realizó a una densidad óptica de 450 nm.

8.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

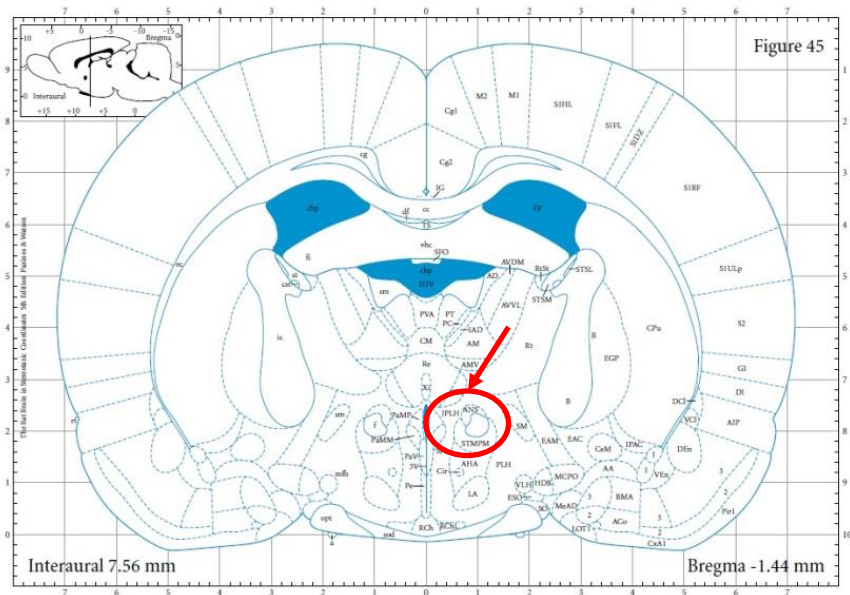
Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism 6 utilizando una ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para los resultados en la conducta alimentaria se utilizó además una prueba post-hoc de Fisher.

9. RESULTADOS

9.1. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

La **figura 8** muestra un corte coronal del cerebro de la rata luego de administrar tinta en las coordenadas indicadas en el Atlas para la colocación adecuada de la cánula en el PVN hipotalámico.

A)



B)

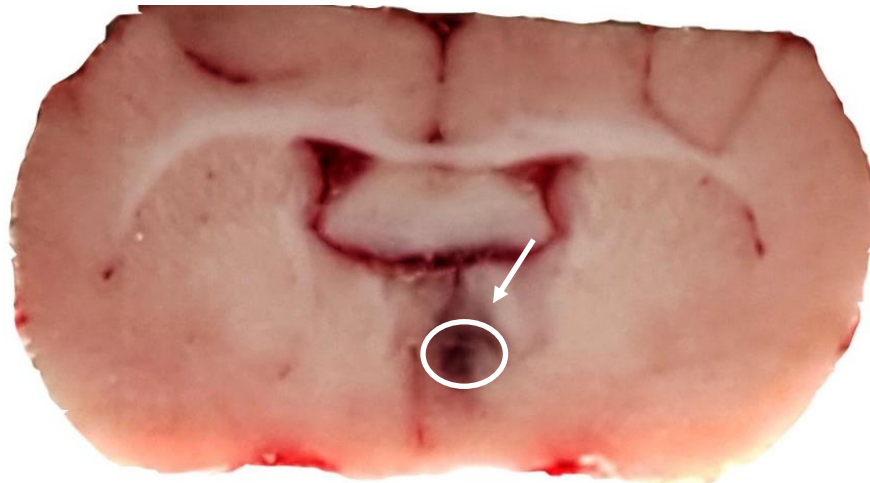


Figura 8. Imagen que representa el PVN hipotalámico. **A)** Imagen obtenida del Atlas del cerebro de rata donde se muestran las coordenadas donde se localiza el PVN. **B)** Imagen representativa del PVN tras la administración de tinta mediante canulación por cirugía estereotáxica. La flecha blanca indica la tinta administrada en el PVN.

Las coordenadas en relación al Bregma para la inyección fueron:

A/P: -1.6 mm

M/L: + 0.3 mm

D/V: -7.5 mm.

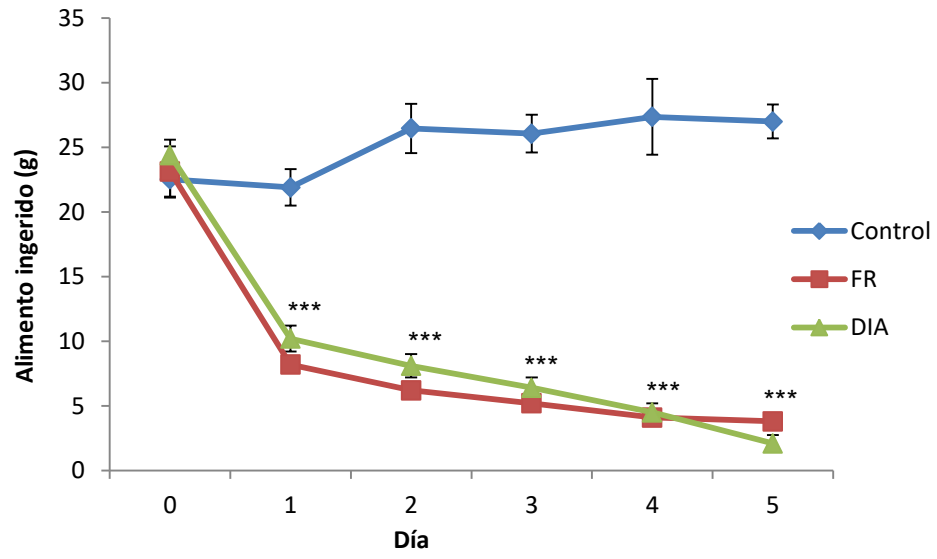
Con el objetivo de conocer el efecto del DOI (agonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) sobre la expresión de TRH en el PVN de ratas con inducción de hambre por FR y de Ketanserina (antagonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) sobre la expresión de TRH en el PVN de ratas con DIA, se formaron los siguientes grupos experimentales de acuerdo a lo descrito en la metodología en el punto 7.2:

- Grupo control
- Grupo FR + vehículo
- Grupo FR + DOI
- Grupo DIA + vehículo
- Grupo DIA + Ketanserina

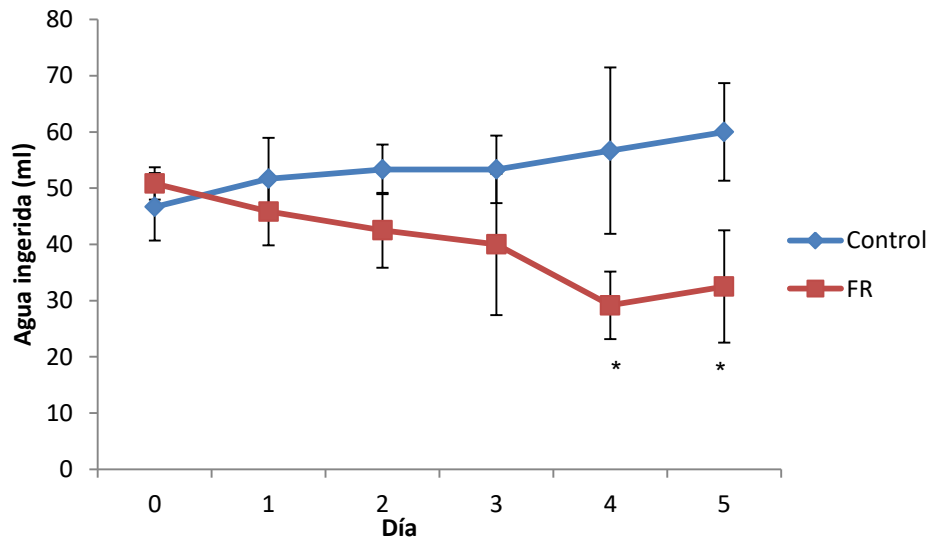
9.2. CONSUMO DE ALIMENTO, AGUA Y PESO DE LOS ANIMALES

La **figura 9** muestra los resultados del alimento y agua ingeridos y peso de los animales de los diferentes grupos experimentales durante los 5 días del modelo de FR y DIA. Es importante mencionar que el consumo de agua en los animales con DIA no se muestra, ya que los animales además de consumirla, parecería que muestran una conducta de tirar el agua, ya que se encontraba la cama de aserrín mojada y el bebedero prácticamente vacío, por lo que no es posible saber cuánto fue el consumo y cuánto fue lo que tiraron.

A)



B)



C)

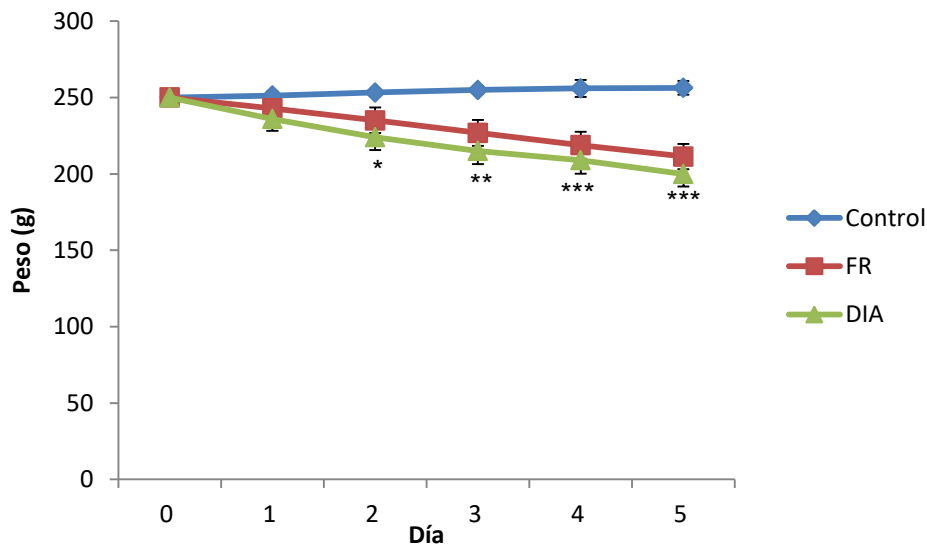


Figura 9. Gráficas que representan el consumo de alimento (A), agua (B) y peso de los animales (C) durante los cinco días de los modelos de FR y DIA. Control: ratas alimentadas *ad libitum* por 5 días y sin administración de fármaco y/o vehículo, FR: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%) o DOI, DIA: ratas con anorexia por deshidratación durante 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%) o Ketanserina. n=22 (Control, DIA) y n=26 (FR). *p<0.05 vs Control, **p<0.0005 vs Control, ***p<0.0001 vs Control. Media ± EEM.

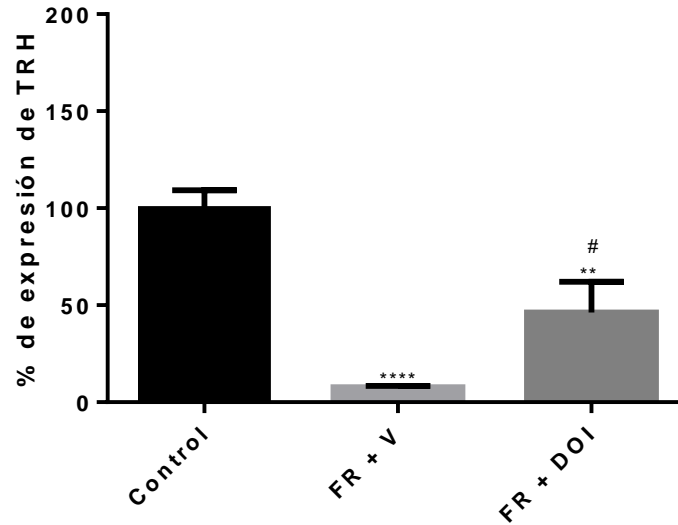
En la **figura 9A** se observa la cantidad de alimento ingerido por los animales de los diferentes grupos. Los grupos de animales sometidos al modelo de FR y DIA ingieren una menor cantidad de alimentos en comparación con el grupo control, esto a partir del día 1. En la **figura 9B** se muestra el agua ingerida por los diferentes grupos y se observó una disminución significativa en los días 4 y 5 entre los grupos FR y el grupo control. En la **figura 9C** se observa que el peso de los animales sometidos a FR y DIA disminuyó significativamente cuando fue comparado con el grupo control a partir del día 2 y hasta el día 5.

9.3. EXPRESIÓN DE pro-TRH RNAm

Al día 5 del modelo de FR y DIA, se administraron los fármacos de acuerdo a lo descrito en el punto 8.2; transcurridos 30 minutos de la administración, los animales fueron sacrificados y se obtuvo el cerebro para su disección. Se

cuantificó la expresión de pro-TRH RNAm en el PVN mediante PCR en tiempo real, los resultados se muestran en la **figura 10**.

A)



B)

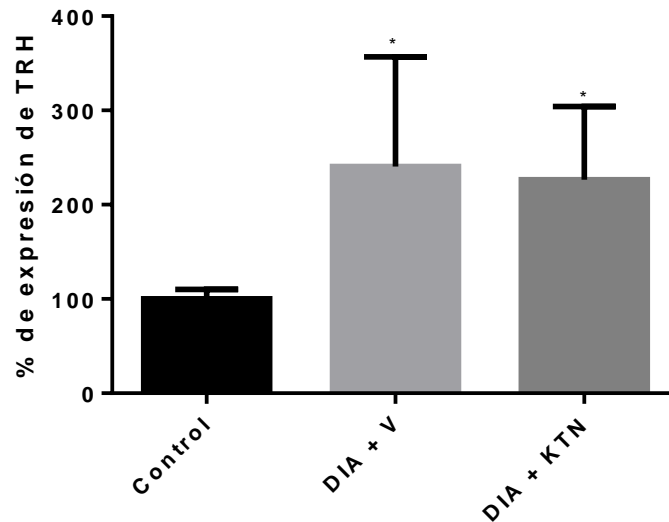


Figura 10. Expresión de pro-TRH RNAm en el PVN cuantificada mediante RT-PCR en tiempo real. Control: ratas alimentadas *ad libitum* por 5 días y sin administración de fármaco y/o vehículo; **A)** FR + V: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), FR + DOI: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con DOI. **B)** DIA + V: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), DIA + KTN: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con ketanserina. n=5 (Control, FR + V, DIA + V), n=3 (FR + DOI) y n=6 (DIA + KTN) *p<0.05 vs Control, **p<0.01 vs Control, ****p<0.001 vs Control, #p<0.05 FR + DOI vs FR + V. Media ± EEM.

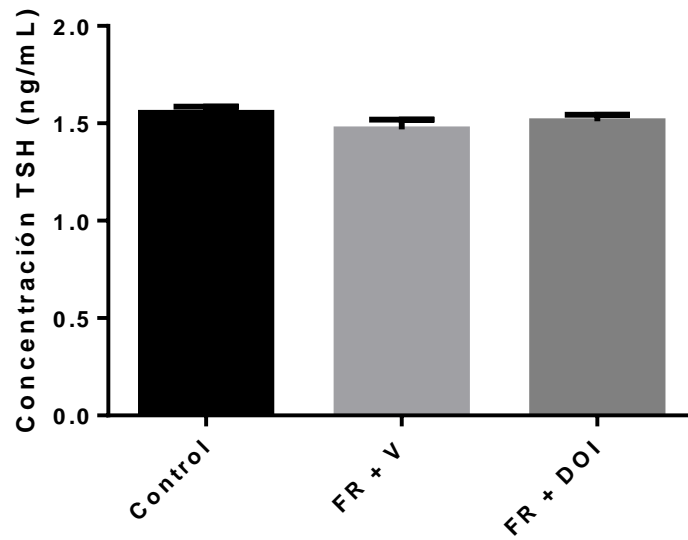
En la **figura 10** se muestra la expresión de pro-TRH RNAm en el PVN cuantificada por PCR en tiempo real. En la **figura 10A** se observa disminución en la expresión de pro-TRH RNAm en ambos grupos de FR en comparación con el grupo control. Luego de la administración de DOI se observó un incremento significativo en la expresión de pro-TRH RNAm en comparación con el vehículo; dicho incremento no revirtió por completo la expresión basal.

La **figura 10B** muestra que la expresión de pro-TRH RNAm en PVN incrementó significativamente en ratas sometidas al modelo de DIA en comparación con el grupo control. En cambio, no se observó diferencia significativa tras la administración del antagonista de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, ketanserina, en comparación con las administradas con vehículo.

9.4. CONCENTRACIONES EN SUERO DE TSH, T₃ Y T₄.

Con la finalidad de determinar la actividad del eje tiroideo, se cuantificó mediante la técnica de ELISA las concentraciones en suero de las hormonas TSH, T₃ y T₄ de los diferentes grupos experimentales. Los resultados se muestran en las **figuras 11, 12 y 13**, respectivamente.

A)



B)

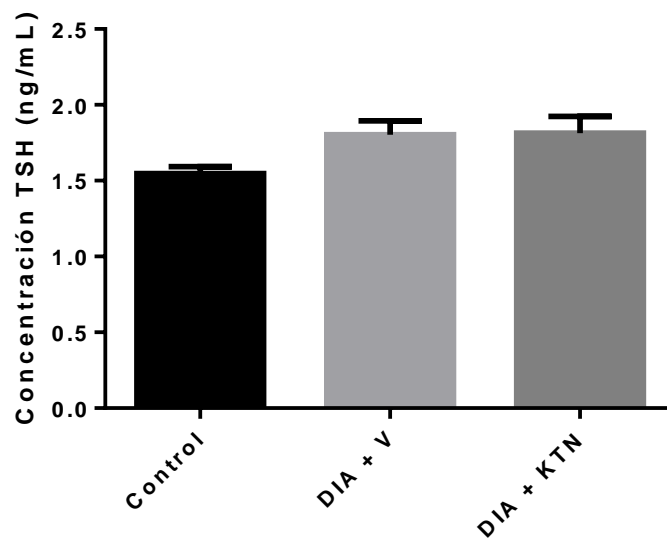
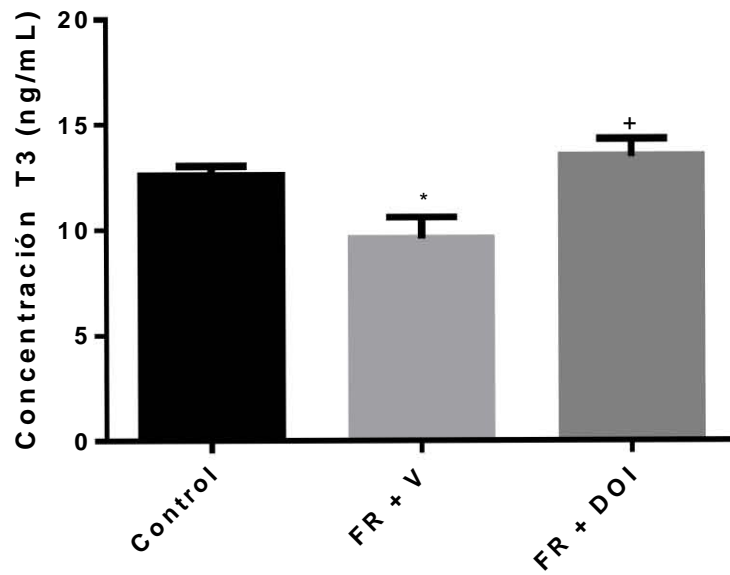


Figura 11. Concentración en suero de TSH cuantificada mediante ELISA. Control: ratas alimentadas *ad libitum* por 5 días y sin administración de fármaco y/o vehículo; **A)** FR + V: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), FR + DOI: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con DOI. **B)** DIA + V: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), DIA + KTN: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con ketanserina. n=9 (Control, FR + DOI), n= 6 (FR + V), n=5 (DIA + V) y n=7 (DIA + KTN). Media \pm EEM.

A)



B)

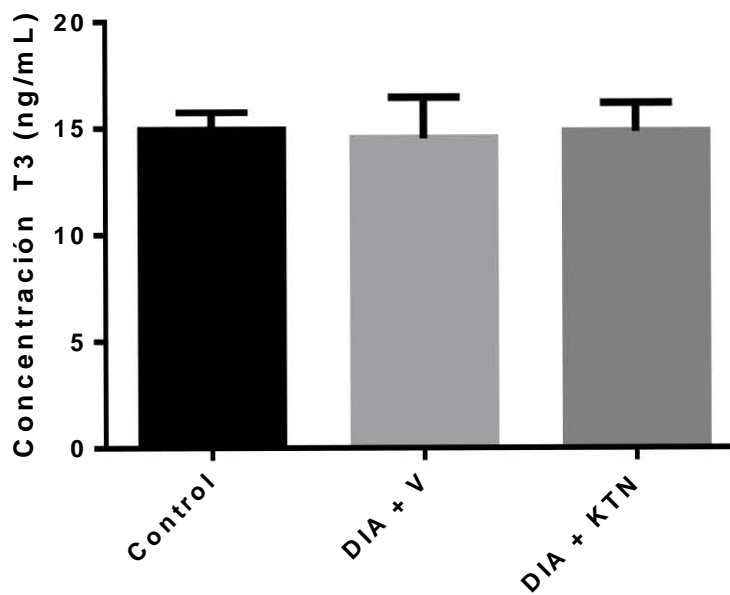
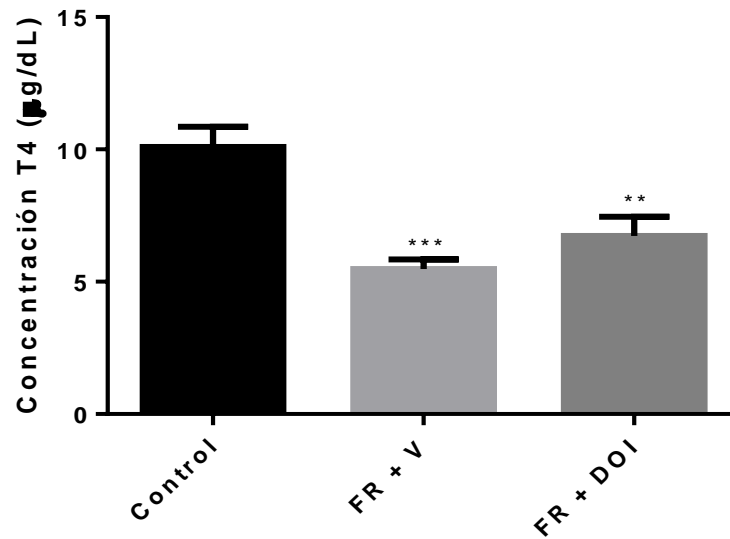


Figura 12. Concentración en suero de T₃ cuantificada mediante ELISA. Control: ratas alimentadas *ad libitum* por 5 días y sin administración de fármaco y/o vehículo; **A)** FR + V: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), FR + DOI: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con DOI. **B)** DIA + V: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), DIA + KTN: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con ketanserina. n=8 (Control), n=6 (FR + V, DIA + V, DIA + KTN) y n=7 (FR + DOI). *p<0.05 vs Control, ⁺p<0.01 vs FR + V. Media ± EEM.

A)



B)

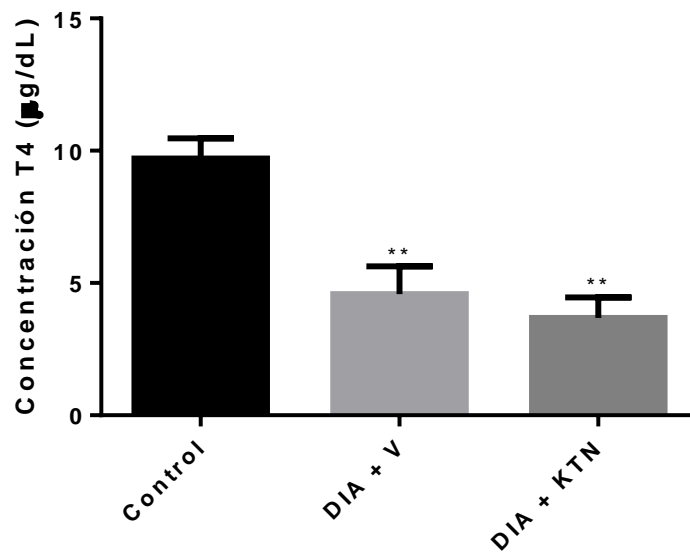


Figura 13. Concentración en suero de T₄ cuantificada mediante ELISA. Control: ratas alimentadas *ad libitum* por 5 días y sin administración de fármaco y/o vehículo; **A)** FR + V: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), FR + DOI: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con DOI. **B)** DIA + V: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), DIA + KTN: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con ketanserina. n=8 (Control), n=7 (FR + V), n=5 (FR + DOI, DIA + KTN) y n=4 (DIA + V). *p<0.05 vs Control, [†]p<0.01 vs FR + V. **p<0.01 vs Control, ***p<0.005 vs Control. Media ± EEM.

En la **figura 11** se muestran la concentración en suero de TSH de los diferentes grupos experimentales. En la **figura 11A y 11B** se no se observan diferencias significativas en los grupos experimentales.

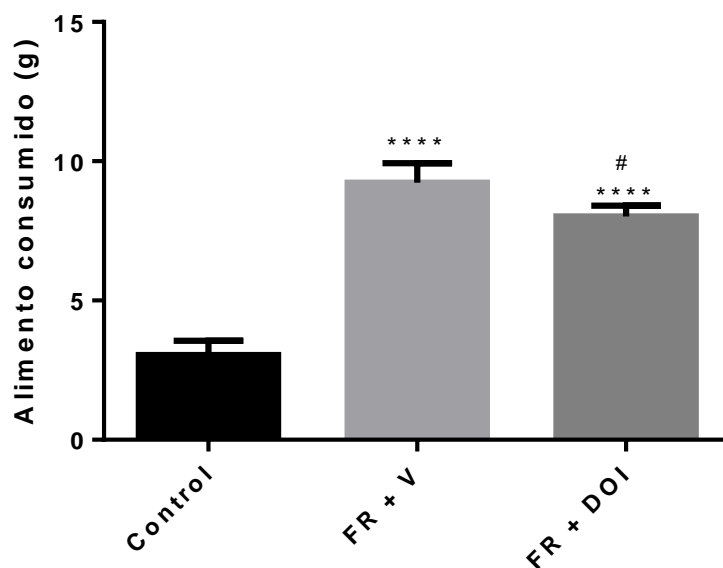
En la **figura 12** se observa la concentración en suero de T_3 de los diferentes grupos experimentales. En la **figura 12A** se observó una disminución significativa en la concentración de T_3 en el grupo con FR, la cual fue revertida tras la administración de DOI. No se observaron diferencias significativas en la concentración en suero de T_3 en los animales con DIA en ambos grupos, resultados que se muestran en la **figura 12B**.

Posteriormente se determinó la concentración en suero de T_4 en los diferentes grupos experimentales, los resultados se muestran en la **figura 13**. En la **figura 13A** se observa una disminución en la concentración en suero de T_4 , los cuales no se vieron afectados tras la administración de DOI. De igual manera, en la **figura 13B** se muestra una disminución significativa en la concentración en suero de T_4 en ratas con DIA, concentración que no mostró cambios después de la administración de ketanserina.

9.5. CONDUCTA ALIMENTARIA

Para conocer el efecto de la vía de la serotonina en la conducta alimentaria en ratas con FR y DIA, se administró DOI y ketanserina, respectivamente, en el PVN de las ratas y transcurridos 30 min de la administración se realimentaron durante 1 hora, la ingesta de alimentos fue cuantificada. Los resultados se muestran en la **figura 14**.

A)



B)

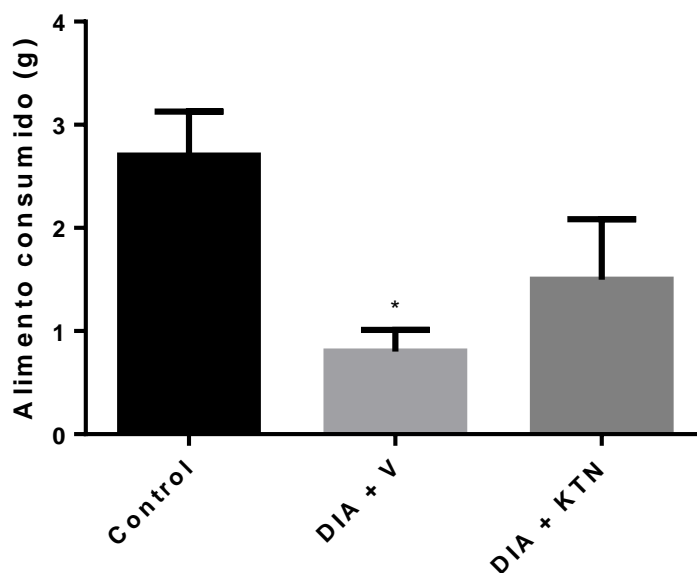


Figura 14. Conducta alimentaria tras la administración de los fármacos. Control: ratas alimentadas *ad libitum* por 5 días sin administración de fármaco y/o vehículo Todos los grupos se realimentaron por 1 h tras la administración del respectivo fármaco; **A)** FR + V: ratas con restricción alimentaria por 5 día y, administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), FR + DOI: ratas con restricción alimentaria por 5 días y administradas al día 5 con DOI. **B)** DIA + V: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con vehículo (solución salina 0.9%), DIA + KTN: ratas con DIA por 5 días y administradas al día 5 con ketanserina. n=8 (Control), n=6 (FR + V) y n=5 (FR + DOI, DIA + V, DIA + KTN). * $p < 0.05$ vs Control, **** $p < 0.001$ vs control, # $p < 0.05$ vs FR+V por prueba de Fisher. Media \pm EEM.

Finalmente, se analizó la conducta alimentaria de los animales con FR y DIA tras la administración de los respectivos fármacos y se observó un incremento significativo en el consumo de alimento en los animales con FR (**figura 14A**). Tras administrar DOI se observó una disminución significativa en el consumo de alimentos en los animales FR tratados con DOI (**figura 14A**). Se muestra una disminución en el consumo de alimentos de los animales con DIA y una ligera tendencia (pero no significativa) a incrementar el consumo de alimentos en los animales con DIA administrados con ketanserina (**figura 14B**).

10. DISCUSIÓN

La anorexia nerviosa es un trastorno muy común en los adolescentes, cuyos síntomas característicos son una severa restricción de alimentos, especialmente de alimentos ricos calóricamente, lo que conlleva a una significativa pérdida de peso. La etiología de este trastorno es compleja e implica factores biopsicosociales; interesantemente, diversos estudios han demostrado cambios significativos en la neurobiología de dichos pacientes [56], lo que conlleva a continuar con los estudios neurobiológicos de esta patología. Existen diversos modelos en roedores para el estudio de la anorexia, siendo uno de ellos el de la anorexia inducida por deshidratación; este modelo nos permite estudiar las diferentes vías de neuropéptidos y neurotransmisores que se encuentran implicados en la conducta alimentaria [6]. En este modelo de estudio se han observado adaptaciones diferenciales en el eje tiroideo, las cuales no han logrado ser explicadas por completo mediante el estudio de las vías neuropeptidérgicas.

Por otro lado, es bien sabido que la serotonina actúa como una señal anorexigénica, lo que permite comprobar su papel en la conducta alimentaria. Así, se ha demostrado que la serotonina en el sistema nervioso central incrementa en la anorexia inducida por caquexia [57].

Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió estudiar la participación de la vía de la serotonina en la regulación de la expresión de TRH en el PVN,

concentraciones en suero de TSH, T_3 y T_4 de ratas con anorexia inducida por deshidratación.

Los resultados obtenidos en el consumo de alimentos y peso de los animales durante ambos modelos concuerdan con lo que se ha reportado con anterioridad y confirman que los modelos empleados son reproducibles [3]. Cabe mencionar que en los animales sometidos al modelo de DIA no fue posible llevar un registro del agua ingerida, ya que se observó que los animales tiran el agua al aserrín de la caja, lo que podría deberse a un posible rechazo de la misma; por eso, no fue posible determinar qué cantidad ingirieron y qué cantidad tiraron.

La disminución en la expresión de TRH en los animales con FR concuerda con lo obtenido previamente [3]; por otro lado, tras la administración de DOI se observó un incremento significativo en la expresión de pro-TRH RNAm en comparación con el vehículo; dicho incremento no revirtió por completo la expresión basal, sin embargo, demostró que la vía de la serotonina regula parcialmente la expresión de TRH en el PVN de ratas con FR. Dado que no se observó diferencia significativa en la expresión de TRH en ratas con DIA tras la administración de ketanserina, se sugiere la posible participación de otros receptores a 5-HT o de otras vías de neurotransmisores en la regulación de la expresión de TRH en ratas con DIA. Además, estudios previos demuestran que la 5-HT estimula la síntesis de TRH en cardiomiocitos de embriones de rata [54], lo que concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo y lo que conlleva a continuar estudiando las vías de neurotransmisores en la adaptación diferencial del eje tiroideo en ratas con DIA.

Los resultados observados en la concentración en suero de TSH resultan interesantes, ya que los antecedentes muestran un decremento en la concentración de TSH en las ratas con FR y un incremento en las ratas con DIA. A pesar de que se observa una tendencia a incrementar la concentración de TSH en las ratas con DIA, no logra ser significativa. Estos resultados indicaron que la administración de DOI y ketanserina no tuvieron efectos sobre la concentración en suero de TSH en ratas con FR y DIA, respectivamente. Por lo tanto, como se mencionó anteriormente, se sugiere la participación de otros

receptores/neurotransmisores en la regulación de la concentración de TSH en dichos animales.

Cabe mencionar que la determinación de la expresión de TRH se realizó en todo el PVN, en donde se sintetiza TRH hipofisotrópico y no hipofisiotrópico, lo que podría explicar los resultados encontrados en la concentración de TSH. De acuerdo a esto, un estudio previo demostró que las ratas con DIA presentan una sobre-expresión de TRH en el PVNa (no hipofisiotrópico) y PVNc (hipofisiotrópico) y presentan menor expresión en el PVNm (hipofisiotrópico) [8]

La concentración en suero de T_3 en los animales con FR que se determinaron concuerda con el incremento en la expresión de TRH en dichos animales, previamente descrita y observada en este estudio. Dado que no se observaron diferencias significativas en la concentración en suero de T_3 en las ratas con DIA tras la administración del fármaco nos indica que la administración de ketanserina no conlleva a efectos en la concentración en suero de T_3 en ratas con DIA. Interesantemente se ha reportado que los receptores a hormonas tiroideas incrementan la sensibilidad de los receptores 5-HT₂ [58, 59], lo que sugiere una posible retroalimentación positiva en las ratas con DIA, resultando importante el posterior estudio del papel de las hormonas tiroideas sobre los receptores a 5-HT en el PVN de ratas con anorexia.

La administración de DOI y ketanserina no indujo a cambios en la concentración en suero de T_4 en ratas con FR y DIA, respectivamente. Estos resultados pueden ser derivados de la concentración en suero de TSH obtenida.

El incremento en el consumo de alimentos en los animales sometidos a FR fue lo esperado tras la restricción alimentaria., Ya que disminuyó el consumo de alimentos en animales con FR tras la administración de DOI, se demuestra el papel anorexigénico de la vía de la serotonina; y una ligera tendencia a incrementar el consumo de alimentos en los animales con DIA y administrados con ketanserina; dicha tendencia pudieran ser significativas al incrementar el tiempo en el que consumen el alimento los animales, además de un posible incremento en la dosis de los respectivos fármacos y de ser así, comprobarían el papel anorexigénico de la serotonina a través de los receptores 2A/2C del PVN [8].

Además, resulta interesante evaluar el papel de otros receptores a 5-HT en la conducta alimentaria de ratas con DIA y FR; en relación a esto, un estudio en ratas con anorexia inducida por lipopolisacárido (modelo en donde está descrito un incremento en la actividad serotoninérgica) demostró el papel anorexigénico de la 5-HT en dicho estudio se administró el agonista al receptor 5-HT_{1A}, el 8-OH-DPAT, y tras esta, el consumo de alimentos incrementó significativamente en las ratas con anorexia [60].

Estos resultados sugieren que la vía de la serotonina pudiera estar modulando parcialmente la expresión de TRH en el PVN de ratas con anorexia por deshidratación. Y como se mencionó anteriormente, previos estudios han demostrado que la serotonina puede estimular la expresión de TRH en cardiomiocitos de embriones de ratas [54], estos estudios y los resultados del presente trabajo, sugieren la participación de la serotonina en la expresión de TRH.

De acuerdo a esto, resulta interesante conocer el mecanismo por el cual la serotonina pudiera regular la expresión de TRH. TRH se expresa gracias al factor de transcripción CREB fosforilado [12]. Diversas vías de señalización pueden fosforilar a CREB, la más conocida es la vía de la PKA, sin embargo, los receptores 5-HT_{2A/2C} no activan esta vía, pero activan la vía de la PKC a través de la proteína Gαq, así, PKC es capaz de fosforilar a CREB, por lo tanto se propone que la regulación de la expresión de TRH mediante los receptores 5-HT_{2A/2C} es mediante la vía de la PKC [61]; cabe mencionar que esta hipótesis debe ser demostrada con posteriores experimentos. Además, estudios han demostrado que la serotonina es capaz de inducir la fosforilación de CREB en células hipotalámicas [62], lo que recalca la posible participación de la serotonina en la expresión de TRH.

Sin embargo, al bloquear farmacológicamente los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} no se revirtió la expresión de TRH en ratas con DIA, sugiriendo que otro receptor de la 5-HT pudiera activarse tras dicho bloqueo. En relación a esto, se ha reportado que los receptores 5-HT₆ juegan un papel importante en la ingesta de alimentos (a pesar de que se expresa en menor proporción que los 2A/2C) y se ha reportado su

actividad en el PVN [42]. Estos receptores se encuentran acoplados a proteínas Gs, por lo que su activación resulta en la activación de PKA [43] y se sabe que PKA fosforila al factor de transcripción CREB, quien activa la transcripción del gen de TRH; de esta manera, la serotonina en ratas con DIA podría modular la expresión de TRH en ratas con DIA.

Así, resulta factible realizar posteriores estudios donde se evalúe la actividad de otros receptores a serotonina en la expresión de TRH y en la conducta alimentaria en ratas con FR y DIA. Además, resulta interesante estudiar la actividad de la Tirosina hidroxilasa en el núcleo del rafe y el contenido de 5-HT en el PVN en ambos grupos de ratas.

De acuerdo a lo anterior, diversos estudios han mostrado que la activación farmacológica de la vía de la serotonina disminuye la liberación de NPY en el PVN en ratas [63], el cual se sabe que su liberación aumenta en la restricción de alimentos (además de que, como se mencionó anteriormente, incrementa el consumo de alimentos); por otro lado, al antagonizar la vía serotoninérgica se estimula el consumo de alimentos aunado al incremento en los niveles de NPY en el ARH y el PVN [64-66]; estos, aunados a los resultados encontrados en este proyecto sugieren la importancia de la vía de la serotonina en la regulación fisiológica y en la conducta alimentaria.

Es importante mencionar que existen pocos estudios que demuestren la relación de la vía de la serotonina y la expresión de TRH; así, posteriores estudios pueden llevarse a cabo para elucidar los mecanismos mediante los cuales la serotonina y otras vías pudieran regular la expresión de TRH en ratas con DIA y FR.

11. CONCLUSIONES

- La activación de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} incrementa la expresión de TRH del PVN en ratas y la concentración en suero de T₃ revirtiendo su disminución inducida por FR.
- La vía de serotonina sí participa en la disminuida expresión de TRH del PVN en ratas con FR.

- El bloqueo farmacológico de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} no revierte la sobre-expresión de TRH que se observa en ratas con DIA.
- Se demostró el papel anorexigénico de la serotonina en el PVN de ratas con FR.
- No se demostró el papel anorexigénico de la serotonina en el PVN de ratas con DIA.

12. REFERENCIAS

1. Ortiga-Carvalho, T.M., et al., *Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis*. Compr Physiol, 2016. **6**(3): p. 1387-428.
2. Mariotti, S. and P. Beck-Peccoz, *Physiology of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000: South Dartmouth (MA).
3. Herwig, A., et al., *Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation*. *Obes Facts*, 2008. **1**(2): p. 71-9.
4. Haleem, D.J., *Improving therapeutics in anorexia nervosa with tryptophan*. *Life Sci*, 2017.
5. Jaimes-Hoy, L., P. Joseph-Bravo, and P. de Gortari, *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. **53**(2): p. 366-77.
6. Yoshimura, M., Y. Uezono, and Y. Ueta, *Anorexia in human and experimental animal models: physiological aspects related to neuropeptides*. *J Physiol Sci*, 2015. **65**(5): p. 385-95.
7. Garcia-Luna, C., et al., *Prepro-orexin and feeding-related peptide receptor expression in dehydration-induced anorexia*. *Regul Pept*, 2010. **159**(1-3): p. 54-60.
8. Alvarez-Salas, E., et al., *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. **153**(8): p. 4067-76.
9. Charnay, Y. and L. Leger, *Brain serotonergic circuitries*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2010. **12**(4): p. 471-87.

10. Simansky, K.J., *Serotonergic control of the organization of feeding and satiety*. Behav Brain Res, 1996. **73**(1-2): p. 37-42.
11. Mebis, L. and G. van den Berghe, *The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in critical illness*. Neth J Med, 2009. **67**(10): p. 332-40.
12. Fekete, C. and R.M. Lechan, *Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions*. Endocr Rev, 2014. **35**(2): p. 159-94.
13. Vella, K.R., et al., *NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways*. Cell Metab, 2011. **14**(6): p. 780-90.
14. Zabavnik, J., G. Arbuthnott, and K.A. Eidne, *Distribution of thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain*. Neuroscience, 1993. **53**(3): p. 877-87.
15. Heuer, H., et al., *Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats*. J Comp Neurol, 2000. **428**(2): p. 319-36.
16. Thompson, B.L. and J.B. Rosen, *Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats*. Neuropeptides, 2000. **34**(1): p. 38-44.
17. Treit, D., J.P. Pinel, and H.C. Fibiger, *Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents*. Pharmacol Biochem Behav, 1981. **15**(4): p. 619-26.
18. Gutierrez-Mariscal, M., et al., *Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety*. Psychoneuroendocrinology, 2008. **33**(2): p. 198-213.
19. Kubek, M.J., et al., *Role of TRH in seizure modulation*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **553**: p. 286-303.
20. Horita, A., *An update on the CNS actions of TRH and its analogs*. Life Sci, 1998. **62**(17-18): p. 1443-8.
21. Choi, Y.H., et al., *TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats*. Physiol Behav, 2002. **77**(1): p. 1-4.
22. Vijayan, E. and S.M. McCann, *Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH)*. Endocrinology, 1977. **100**(6): p. 1727-30.

23. Suzuki, T., et al., *Intracranial injection of thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats.* Pharmacol Biochem Behav, 1982. **17**(2): p. 249-53.
24. Puga, L., et al., *TRH injected into the nucleus accumbens shell releases dopamine and reduces feeding motivation in rats.* Behav Brain Res, 2016. **306**: p. 128-36.
25. Ferguson, A.V., K.J. Latchford, and W.K. Samson, *The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction.* Expert Opin Ther Targets, 2008. **12**(6): p. 717-27.
26. Nillni, E.A., *Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs.* Front Neuroendocrinol, 2010. **31**(2): p. 134-56.
27. Charli, J.L., et al., *TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II.* Neurobiology (Bp), 1998. **6**(1): p. 45-57.
28. Grimm, E.R. and N.I. Steinle, *Genetics of eating behavior: established and emerging concepts.* Nutr Rev, 2011. **69**(1): p. 52-60.
29. Sasaki, T., *Neural and Molecular Mechanisms Involved in Controlling the Quality of Feeding Behavior: Diet Selection and Feeding Patterns.* Nutrients, 2017. **9**(10).
30. Health, T.N.I.o.M. *Eating Disorders.* 2016; Available from: https://www.nimh.nih.gov/health/topics/eatingdisorders/index.shtml?utm_source=rss&utm_medium=rss.
31. Darrow, S.M., et al., *Exploring Types of Family Environments in Youth with Eating Disorders.* Eur Eat Disord Rev, 2017. **25**(5): p. 389-396.
32. Vartanian, L.R. and A.M. Porter, *Weight stigma and eating behavior: A review of the literature.* Appetite, 2016. **102**: p. 3-14.
33. Haller, E., *Eating disorders. A review and update.* West J Med, 1992. **157**(6): p. 658-62.
34. Lee, S. and A.P. Farwell, *Euthyroid Sick Syndrome.* Compr Physiol, 2016. **6**(2): p. 1071-80.
35. Watts, A.G., D.S. Salter, and C.M. Neuner, *Neural network interactions and ingestive behavior control during anorexia.* Physiol Behav, 2007. **91**(4): p. 389-96.
36. Coppola, A., R. Meli, and S. Diano, *Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats.* Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2827-33.

37. Alvarez-Salas, E., et al., *Mct8 and trh co-expression throughout the hypothalamic paraventricular nucleus is modified by dehydration-induced anorexia in rats*. *Neuropeptides*, 2016. **56**: p. 33-40.
38. Ciosek, J. and J. Drobnik, *Vasopressin and oxytocin release and the thyroid function*. *J Physiol Pharmacol*, 2004. **55**(2): p. 423-41.
39. Smith, S.M. and W.W. Vale, *The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress*. *Dialogues Clin Neurosci*, 2006. **8**(4): p. 383-95.
40. Chalmers, D.T., T.W. Lovenberg, and E.B. De Souza, *Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression*. *J Neurosci*, 1995. **15**(10): p. 6340-50.
41. Bale, T.L., et al., *Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress*. *Nat Genet*, 2000. **24**(4): p. 410-4.
42. Hillhouse, E.W. and D.K. Grammatopoulos, *The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology*. *Endocr Rev*, 2006. **27**(3): p. 260-86.
43. de Gortari, P., et al., *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. **34**(2): p. 259-72.
44. Hensler, J.G., *Serotonin*, in *Basic Neurochemistry*, Elsevier, Editor 2012, American Society for Neurochemistry. p. 300-322.
45. Pytliak, M., et al., *Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications*. *Physiol Res*, 2011. **60**(1): p. 15-25.
46. De Vry, J. and R. Schreiber, *Effects of selected serotonin 5-HT(1) and 5-HT(2) receptor agonists on feeding behavior: possible mechanisms of action*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(3): p. 341-53.
47. Bagdy, G., *Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT1A, 5-HT2A and 5-HT2C receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses*. *Behav Brain Res*, 1996. **73**(1-2): p. 277-80.
48. Leibowitz, S.F. and J.T. Alexander, *Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight*. *Biol Psychiatry*, 1998. **44**(9): p. 851-64.

49. Nonogaki, K., et al., *Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT_{2C} receptor gene*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1152-6.
50. Tecott, L.H., et al., *Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 542-6.
51. Rastogi, R.B., R.L. Singhal, and Y.D. Lapierre, *Thyrotropin releasing hormone potentiates the effects of imipramine on brain serotonergic system*. Brain Res Bull, 1981. **7**(4): p. 449-51.
52. Rastogi RB, S.R., Lapierre YD, *Effects of MK-771, a novel TRH analog, on brain dopaminergic and serotonergic systems*. European J. Pharmacol, 1981. **73**(4): p. 307-312.
53. Pranzatelli, M.R., A. Dailey, and S. Markush, *The regulation of TRH and serotonin receptors: chronic TRH and analog administration in the rat*. J Recept Res, 1988. **8**(5): p. 667-81.
54. Shi, Z.X., et al., *Serotonin (5-HT) stimulates thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene transcription in rat embryonic cardiomyocytes*. Endocrine, 1997. **6**(2): p. 153-8.
55. Currie, P.J., et al., *Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **71**(4): p. 709-16.
56. Brockmeyer, T., H.C. Friederich, and U. Schmidt, *Advances in the treatment of anorexia nervosa: a review of established and emerging interventions*. Psychol Med, 2018. **48**(8): p. 1228-1256.
57. Ezeoke, C.C. and J.E. Morley, *Pathophysiology of anorexia in the cancer cachexia syndrome*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2015. **6**(4): p. 287-302.
58. Whybrow, P.C. and A.J. Prange, Jr., *A hypothesis of thyroid-catecholamine-receptor interaction. Its relevance to affective illness*. Arch Gen Psychiatry, 1981. **38**(1): p. 106-13.
59. Bauer, M., et al., *Effects of supraphysiological thyroxine administration in healthy controls and patients with depressive disorders*. J Affect Disord, 2002. **68**(2-3): p. 285-94.
60. Hrupka, B.J. and W. Langhans, *A role for serotonin in lipopolysaccharide-induced anorexia in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 2001. **68**(2): p. 355-62.
61. Aguilera, G. and Y. Liu, *The molecular physiology of CRH neurons*. Front Neuroendocrinol, 2012. **33**(1): p. 67-84.

62. Oury, F., et al., *CREB mediates brain serotonin regulation of bone mass through its expression in ventromedial hypothalamic neurons*. *Genes Dev*, 2010. **24**(20): p. 2330-42.
63. Dryden, S., et al., *The serotonin (5-HT) antagonist methysergide increases neuropeptide Y (NPY) synthesis and secretion in the hypothalamus of the rat*. *Brain Res*, 1995. **699**(1): p. 12-8.
64. Dube, M.G., et al., *Effect of d-fenfluramine on neuropeptide Y concentration and release in the paraventricular nucleus of food-deprived rats*. *Brain Res Bull*, 1992. **29**(6): p. 865-9.
65. Rogers, P., P.E. McKibbin, and G. Williams, *Acute fenfluramine administration reduces neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of the rat: possible implications for the anorectic effect of fenfluramine*. *Peptides*, 1991. **12**(2): p. 251-5.
66. Dryden, S., et al., *The serotonergic agent fluoxetine reduces neuropeptide Y levels and neuropeptide Y secretion in the hypothalamus of lean and obese rats*. *Neuroscience*, 1996. **72**(2): p. 557-66.