

# **UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS**

---

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL TRANSCRITO  
REGULADO POR COCAÍNA Y ANFETAMINAS EN EL  
HIPOTÁLAMO LATERAL, EN EL NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR Y EN EL NÚCLEO ARCUATO DEL  
HIPOTÁLAMO DE RATAS MACHO EN DOS MODELOS DE  
ANOREXIA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**PRESENTA**

**LIC. NUT. CINTHIA BERENICE GARCÍA LUNA**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO  
DR. HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**JUNIO 2011**

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Molecular de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", bajo la supervisión de la Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo y se contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto 61410.

Se agradece el apoyo académico recibido por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; así como el apoyo económico recibido del CONACyT (becario: 266700)

## Resumen

El transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript, CART) es un péptido anorexigénico (inhibe la ingestión alimentaria) que se sintetiza en diversos núcleos hipotalámicos, como el núcleo paraventricular (NPV), el núcleo arcuato (ARC) y el hipotálamo lateral/área perifornical (HL), y cuya expresión es regulada por leptina e insulina. La anorexia nervosa es un desorden de etiología compleja que cursa con cambios endócrinos y metabólicos que ocurren por el ayuno prolongado. La conducta de anorexia (disminución del consumo de alimento que es ofrecido *ad libitum* y pérdida de peso) puede inducirse sometiendo a los animales a deshidratación (AN) mediante el consumo de solución salina al 2.5% como líquido de bebida y alimento *ad libitum*. Como control (C) se utilizan animales que beben agua sola y tienen alimentación *ad libitum* y un segundo control son animales que se mantienen con restricción alimentaria forzada (RA) y cuyo consumo es pareado al de AN (estos animales permanecen con apetito, a diferencia de los AN). Las ratas RA y las AN presentan un aumento similar en la expresión de péptidos orexigénicos (estimulan la ingestión alimentaria) del núcleo arcuato del hipotálamo (ARC) como neuropéptido Y (NPY), en la concentración sérica de corticosterona y reducción de la de leptina. Una de las diferencias entre RA y AN es la adaptación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HHT) frente a la baja disponibilidad alimentaria; durante la RA la expresión del RNAm de *pro-TRH* disminuye a pesar de la baja concentración sérica de las hormonas tiroideas (HT), desarrollando hipotiroidismo terciario. Esto es contrario a lo que sucede en las ratas AN, donde la expresión del gen *pro-TRH* se encuentra aumentada y desarrollan hipotiroidismo primario, evidenciando la falta de adaptación del eje de los animales AN frente al balance energético negativo. Algunos péptidos que se han implicado en la conducta de anorexia en AN son las orexinas y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) del HL, la vía de señalización de NPY y de leptina en NPV. Por otra parte, la cepa Wistar Kyoto (WKY) es un modelo animal propuesto como modelo de anorexia en este trabajo, ya que desarrolla signos de anorexia debido al estrés crónico, como la pérdida de peso corporal y la disminución del consumo de alimento, a diferencia de las Wistar wild type (CW); por lo que podría constituir un modelo "natural" de la enfermedad. El objetivo del estudio fue definir la participación de

CART del HL, NPV y ARC en la conducta de anorexia en ratas macho en dos modelos experimentales. 1° modelo experimental, anorexia por deshidratación: Ratas Wistar machos de 255g, mantenidas con temperatura (25°C) y ciclo luz-oscuridad (7:00 a 19:00 hrs) controlados. Se formaron tres grupos: AN consumiendo solución salina al 2.5% como bebida y alimento *ad libitum*; RA con agua *ad libitum* y misma cantidad de alimento ingerida por AN; C con alimento y agua *ad libitum*. En el 2° modelo, cepa Wistar Kyoto: CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto) con consumo de alimento y agua *ad libitum*. Se registraron diariamente los pesos y el consumo de alimento y se sacrificaron los animales el día 7. Se extrajo el cerebro y congeló a -70°C para cortar rebanadas de 14 µm conteniendo NPV, HL y ARC (coordenada -1.08 a 3 mm de Bregma), y efectuar el análisis de la expresión del gen *CART* por medio de histoquímica por hibridación *in situ* (ISH); la sangre troncal para medir T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, TSH y corticosterona por radioinmunoensayo, y leptina por ELISA. Los animales RA presentaron la expresión del RNAm de *CART* disminuido significativamente en NPVa y ARC vs C llegando a 26 y 45% del control respectivamente; mientras que en AN no hubo cambio; *CART* también disminuyó significativamente en HL de RA vs C y AN llegando a 25% del control. Los animales WKY presentaron la concentración sérica de leptina disminuida, siendo ésta indetectable. La expresión del RNAm de *CART* aumentó en NPVa, NPVm y NPVp de animales WKY vs CW, alcanzando 251, 169 y 208% respectivamente. Las alteraciones en la expresión del RNAm del gen *CART* en animales AN podrían contribuir a la modificación en la motivación por el consumo de alimento de estas ratas; así como la expresión diferencial del RNAm del gen *CART* en animales WKY vs CW podría contribuir a la aparición de la conducta de anorexia en éstos animales.

# Índice

<b>I</b>	<b>Introducción</b>	<b>1</b>
1.1	Regulación de la homeostasis energética	1
1.2	Aspectos generales del transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART)	5
1.3	Anorexia Nervosa	9
1.4	Modelos animales de anorexia	14
<b>II</b>	<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
2.1	Objetivo general	25
2.2	Objetivos específicos	25
<b>III</b>	<b>Estrategia experimental</b>	<b>26</b>
3.1	Animales	26
3.2	Experimentos	26
<b>IV</b>	<b>Metodología</b>	<b>29</b>
4.1	Extracción de RNA total	29
4.2	Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	31
4.3	Radioinmunoensayos (RIA's)	34
4.4	Cuantificación de la concentración sérica de leptina por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	37
4.5	Análisis de la expresión del gen <i>CART</i> por medio de histoquímica por hibridación <i>in situ</i>	38
4.6	Análisis estadístico de resultados	40
<b>V</b>	<b>Resultados</b>	<b>41</b>
5.1	Peso corporal	41
5.2	Consumo de alimento	43
5.3	Consumo de líquido	45
5.4	Peso masa grasa/Kg peso corporal	47
5.5	Corticosterona sérica	48
5.6	Tirotropina sérica	49
5.7	Triyodotironina sérica	51
5.8	Tiroxina sérica	53
5.9	Leptina sérica	54
5.10	Expresión del RNAm de <i>CART</i> por RT-PCR en animales Wistar Kyoto	56
5.11	Expresión del RNAm de <i>CART</i> por ISH	57
5.12	Resumen de resultados integrados	67

<b>VI</b>	<b>Discusión</b>	68
6.1	Peso corporal y consumo de alimento	68
6.2	Cambios en el eje HHA	74
6.3	Cambios en el eje HHT	78
6.4	Leptina	83
6.5	Expresión de <i>CART</i> en el hipotálamo	87
6.6	Conclusiones y Perspectivas	94
<b>VII</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	95

## Índice de figuras

<b>Fig. 1</b>	Regiones cerebrales involucradas con la conducta alimentaria	2
<b>Fig. 2</b>	Estructura secundaria del péptido <i>CART</i>	5
<b>Fig. 3</b>	Diagrama esquemático del gen <i>CART</i>	8
<b>Fig. 4</b>	Diagrama del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT)	14
<b>Fig. 5</b>	Optimización metodológica de RT-PCR para <i>CART</i>	32
<b>Fig. 6</b>	Optimización metodológica de RT-PCR para <i>TRH</i>	33
<b>Fig. 7</b>	Registro del peso corporal, anorexia por deshidratación	42
<b>Fig. 8</b>	Registro del peso corporal, cepa Wistar Kyoto	43
<b>Fig. 9</b>	Registro del consumo de alimento, anorexia por deshidratación	44
<b>Fig. 10</b>	Registro del consume de alimento, cepa Wistar Kyoto	45
<b>Fig. 11</b>	Registro del consumo de líquido, anorexia por deshidratación	46
<b>Fig. 12</b>	Registro del peso del tejido adiposo abdominal, cepa Wistar Kyoto	47
<b>Fig. 13</b>	Registro del peso del tejido subescapular, cepa Wistar Kyoto	48
<b>Fig. 14</b>	Concentración sérica de corticosterona, anorexia por deshidratación	49
<b>Fig. 15</b>	Concentración sérica de TSH, anorexia por deshidratación	50
<b>Fig. 16</b>	Concentración sérica de TSH, cepa Wistar Kyoto	51
<b>Fig. 17</b>	Concentración sérica de T <sub>3</sub> , anorexia por deshidratación	52
<b>Fig. 18</b>	Concentración sérica de T <sub>3</sub> , cepa Wistar Kyoto	53
<b>Fig. 19</b>	Concentración sérica de T <sub>4</sub> , anorexia por deshidratación	54
<b>Fig. 20</b>	Concentración sérica de leptina, anorexia por deshidratación	55
<b>Fig. 21</b>	Expresión del RNAm de <i>CART</i> por RT-PCR, cepa Wistar Kyoto	56
<b>Fig. 22</b>	Fotomicrografía en campo oscuro del RNAm de <i>CART</i> en NPV anterior, medio y posterior por ISH, anorexia por deshidratación	58

<b>Fig. 23</b>	Análisis de la expresión del RNAm de <i>CART</i> en NPV anterior, medio y posterior por ISH, anorexia por deshidratación	59
<b>Fig. 24</b>	Fotomicrografía en campo oscuro del RNAm de <i>CART</i> en el HL y ARC por ISH, anorexia por deshidratación	60
<b>Fig. 25</b>	Análisis de la expresión del RNAm de <i>CART</i> en el HL y ARC por ISH, anorexia por deshidratación	61
<b>Fig. 26</b>	Fotomicrografía en campo oscuro del RNAm de <i>CART</i> en NPV anterior, medio y posterior por ISH, cepa Wistar Kyoto	63
<b>Fig. 27</b>	Análisis de la expresión del RNAm de <i>CART</i> en NPV anterior, medio y posterior por ISH, cepa Wistar Kyoto	64
<b>Fig. 28</b>	Fotomicrografía en campo oscuro del RNAm de <i>CART</i> en el HL y ARC por ISH, cepa Wistar Kyoto	65
<b>Fig. 29</b>	Análisis de la expresión del RNAm de <i>CART</i> en el HL y ARC por ISH, cepa Wistar Kyoto	66

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Neuropéptidos y neurotransmisores que regulan la homeostasis energética	3
<b>Tabla 2</b>	Cambios metabólicos que se presentan en pacientes con anorexia nervosa y en los modelos experimentales	24
<b>Tabla 3</b>	Condiciones para PCR de los oligonucleótidos de estudio	33
<b>Tabla 4</b>	Resumen de resultados integrados	67

## Lista de abreviaturas

**ACTH:** hormona adrenocorticotrópica

**AgRP:** péptido relacionado al Agouti

**AN:** anorexia por deshidratación, grupo experimental en el paradigma de anorexia por deshidratación

**ANOVA:** análisis de varianza

**ARC:** núcleo arcuato del hipotálamo

**BAT:** tejido adiposo pardo (subescapular)

**C:** control, grupo experimental en el paradigma de anorexia por deshidratación

**CART:** transcrito regulado por cocaína y anfetaminas

**CCK:** colecistoquinina

**CREB:** proteína de unión al elemento de respuesta AMPc

**CRH:** hormona liberadora de corticotropina

**CW:** ratas Wistar wild type, grupo control en el paradigma de la cepa Wistar Kyoto

**D1:** desyodasa tipo 1

**D2:** desyodasa tipo 2

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**GC:** glucocorticoides

**HHA:** eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

**HHT:** eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

**HL:** hipotálamo lateral

**HT:** hormonas tiroideas

**i.c.v.:** intracerebroventricular

**i.p.:** intraperitoneal

**ISH:** hibridación *in situ*

**MCH:** hormona concentradora de melanina

**NDM:** núcleo dorsomedial del hipotálamo

**NPV:** núcleo paraventricular del hipotálamo

**NPVa:** núcleo paraventricular anterior

**NPVm:** núcleo paraventricular medio

**NPVp:** núcleo paraventricular posterior

**NPY:** neuropéptido Y

**NPY-Y1:** receptor de neuropéptido Y tipo 1

**NTS:** núcleo del tracto solitario

**NVM:** núcleo ventromedial del hipotálamo

**ObRb:** receptor de leptina

**POMC:** pro-opiomelanocortina

**RA:** restricción alimentaria, grupo experimental en el paradigma de anorexia por deshidratación

**RIA's:** radioinmunoensayos

**RNAm:** ácido ribonucleico mensajero

**RT-PCR:** transcripción reversa- reacción en cadena de la polimerasa

**SNC:** sistema nervioso central

**SNP's:** polimorfismos de un solo nucleótido

**STAT:** activador de la transcripción y transductor de señales

**TCA:** trastornos de la conducta alimentaria

**TRH:** hormona liberadora de tirotropina

**TSH:** tirotropina

**TSHR:** receptor de TSH

**T<sub>3</sub>:** triyodotironina

**T<sub>4</sub>:** tiroxina

**WAT:** tejido adiposo blanco (abdominal)

**WKY:** ratas Wistar Kyoto, grupo experimental en el paradigma de la cepa Wistar Kyoto

**3V:** tercer ventrículo

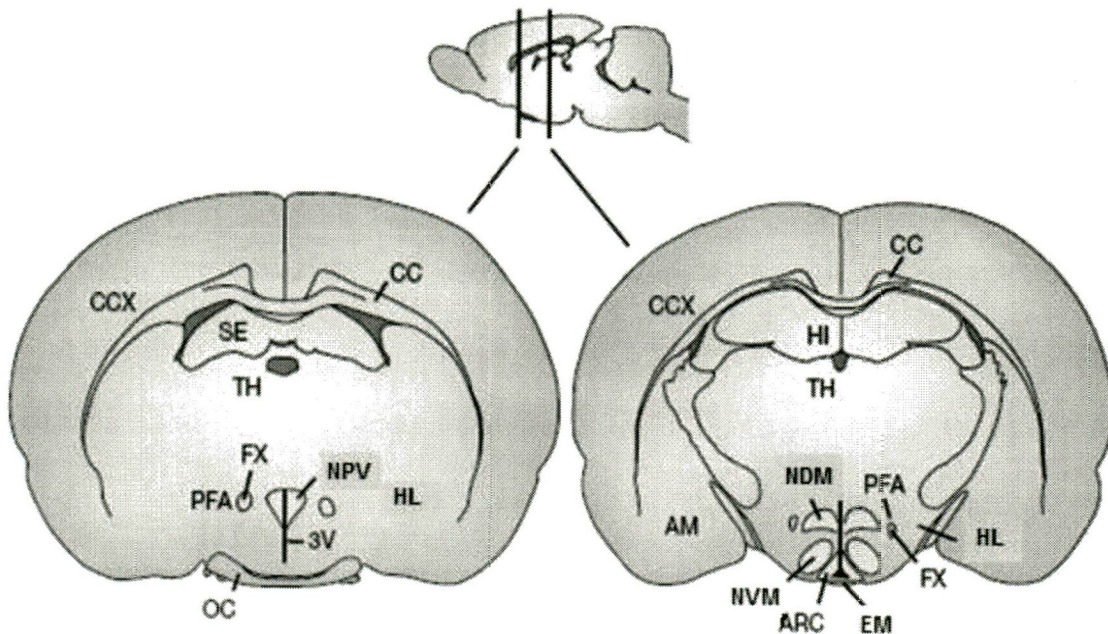
# I. Introducción

## 1.1 Regulación de la homeostasis energética

La ingestión alimentaria y el peso corporal son regulados por múltiples factores, incluyendo los endócrinos, péptidos y neurotransmisores del Sistema Nervioso Central (SNC) (1, 2). Para mantener el balance entre la ingestión y el gasto energético (homeostasis energética) existe un sistema fisiológico complejo compuesto por sistemas periféricos que incluyen la estimulación gustativa, la secreción de péptidos gastrointestinales como la colecistoquinina (CCK) y la grelina, y que tienen receptores tanto en el núcleo del tracto solitario (NTS), como en el núcleo arcuato hipotalámico (ARC), desde donde se liberan en respuesta péptidos que regulan la conducta alimentaria (3-7). Se entiende por conducta alimentaria al comportamiento relacionado con los hábitos de alimentación y las cantidades ingeridas de alimento. Para efecto de este trabajo se entenderá por conducta alimentaria a la cantidad de alimento ingerida por los animales.

El hipotálamo es el sitio donde se integran todas estas señales y que se encarga de la regulación de las conductas motivacionales, la homeostasis energética, las respuestas al estrés, entre otras (8); además también actúa como regulador de varios sistemas críticos para la supervivencia, como la temperatura, la reproducción, el balance hormonal y la regulación energética (9). La estructura del hipotálamo consiste de varios núcleos, incluyendo el núcleo arcuato (ARC), el núcleo paraventricular (NPV), el

hipotálamo lateral (HL), el núcleo ventromedial (NVM) y el dorsomedial (NDM) (Fig. 1) (8, 10-12).



**Fig. 1.** Diagrama del cerebro de la rata, mostrando los núcleos hipotalámicos involucrados en el control de la conducta alimentaria. La figura superior es una vista longitudinal del cerebro de la rata, con el bulbo olfatorio en la terminación anterior (izquierda), y el cerebelo en la terminación caudal (derecha). Dos secciones coronales indicando el sitio del corte con líneas verticales se muestran debajo. ARC, núcleo arcuato; NPV, núcleo paraventricular; PFA, área perifornical; FX, fórnix; LH, hipotálamo lateral; NVM, núcleo ventromedial; NDM, núcleo dorsomedial; AM, amígdala; CC, cuerpo calloso; CCX, corteza cerebral; HI, hipocampo; EM, eminencia media; OC, quiasma óptico; SE, septum; TH, tálamo; 3V, tercer ventrículo (5) .

En los núcleos hipotalámicos se sintetizan diversos neuropéptidos, que tienen influencia en la homeostasis energética y también en la motivación por la búsqueda de alimentos;

los péptidos orexigénicos, estimulan la ingestión alimentaria, y los anorexigénicos la inhiben (Tabla 1) (3, 12).

**Tabla 1.** Neuropéptidos y neurotransmisores que regulan la homeostasis energética (3).

<b>Orexigénicos (estimulan la ingestión alimentaria)</b>	<b>Anorexigénicos (inhiben la ingestión alimentaria)</b>
Neuropéptido Y (NPY)	Hormona liberadora de tirotrópina (TRH)
Péptido relacionado al Agouti (AgRP)	Hormona liberadora de corticotropina (CRH)
Hormona concentradora de melanina (MCH)	Hormona $\alpha$ estimulante de melanocortina ( $\alpha$ -MSH)
Orexinas A y B	Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART)
Galanina	Urocortina
Noradrenalina	Pro-opiomelanocortina (POMC)
Glutamato	Péptido parecido al glucagón 1 (GLP-1)
Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)	Neurotensina

Hay dos poblaciones neuronales primarias en el ARC que integran las señales del estado de nutrición y tienen influencia en la homeostasis energética, a las que se les llama neuronas de primer orden (13), encargadas de censar las señales periféricas por medio de la eminencia media (14). El primer circuito neuronal inhibe la ingestión alimentaria vía la expresión de los neuropéptidos anorexigénicos pro-opiomelanocortina

(POMC) y el transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART), cuyos RNAm co-localizan en neuronas de la parte lateral del ARC (15, 16); mientras que el segundo circuito neuronal estimula la ingestión alimentaria por medio de la síntesis y liberación del neuropéptido Y (NPY) y de la proteína relacionada al Agouti (AgRP) desde neuronas localizadas en la parte media del ARC (17, 18); ambas poblaciones de neuronas proyectan sus axones hacia neuronas de segundo orden del NPV, NDM, NVM e HL (5, 10, 19).

El NPV integra señales de diversos núcleos hipotalámicos, de la corteza sensorial y de regiones límbicas (1, 20); las neuronas de este núcleo proyectan hacia varias regiones cerebrales y a la eminencia media (denominadas hipofisiotrópicas) induciendo cambios en el metabolismo, en la motivación de los animales por la búsqueda de alimento y en la regulación de la homeostasis energética (21). Las neuronas hipofisiotrópicas del NPV actúan como traductores neuroendócrinos, que en respuesta a un estímulo, liberan péptidos a la circulación porta-hipofisaria, actuando como hormonas al llegar a la adenohipófisis. Dos importantes tipos de neuronas del NPV que regulan el metabolismo energético son aquéllas que sintetizan a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), que controla la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), y las que sintetizan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que regula el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (12, 19).

Otro núcleo hipotalámico involucrado en la regulación de la conducta alimentaria es el hipotálamo lateral/área perifornical del hipotálamo, el cual contiene neuronas que sintetizan neuropéptidos que modulan la alimentación, como la hormona concentradora



Aún no se ha caracterizado el receptor para CART, pero se piensa que el péptido actúa a través de un receptor acoplado a proteína G, activando la vía de señalización de la proteína de unión al elemento de respuesta AMPc (CREB) o fosforilando a la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) (33). Esto se ha propuesto por medio de estudios donde se ha utilizado a la toxina *Pertussis* de la bacteria *Bordetella Pertussis*, la cual tiene actividad de enzima ADP-ribosilasa. Esta toxina inhibe a la proteína G inhibitoria ( $G_i/G_o$ ) (34). Lo que se ha encontrado es que la administración de CART 55-102 a un cultivo celular hipocampal inhibe la despolarización de la membrana dependiente de  $Ca^{+}$  por medio de la acción de la toxina sobre  $G_i/G_o$  (35). Por otra parte, se ha encontrado que la administración *in vitro* de CART 55-102 en células AtT20 y GH3, aumenta la fosforilación de ERK, efecto que es bloqueado por la toxina *Pertussis*, así como por un inhibidor de las proteínas cinasa activada por mitógenos (MEK, cinasa que fosforila a ERK) (36).

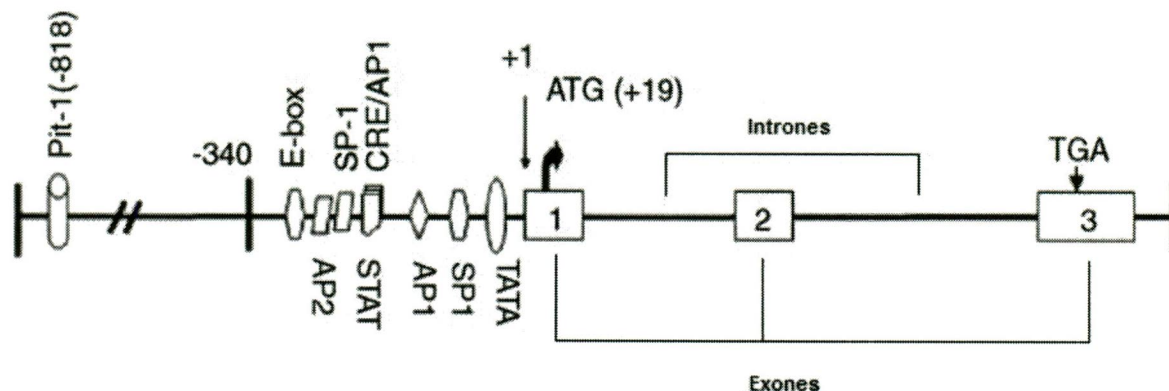
En un estudio llevado a cabo en animales que fueron ayunados y otros alimentados, a los cuales se les administró CART i.c.v. se encontró que la fosforilación de CREB aumentó significativamente en las neuronas del NPV que sintetizan CRH (37). Además de estas evidencias podría ser que CART transmita su señal por más de una vía, ya que en las neuronas de TRH del NPV si aumenta la expresión del gen *TRH* aunque no se observa el aumento de CREB fosforilado (38).

### 1.2.1 Gen *CART*

En el genoma humano, el gen que codifica para *CART* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5 (*locus* 5q13-q14) (39), mientras que en el de la rata se encuentra en el brazo largo del cromosoma 2 (*locus* 2q12) (32).

En la rata, el gen *CART* tiene una longitud de 2 kilobases (kb) aproximadamente y contiene 3 exones separados por 2 intrones (Fig. 3) (39). La transcripción del gen resulta en 2 variantes de RNAm producidas por edición alternativa (splicing), que produce 2 propéptidos de diferente longitud llamados pro*CART* 1-89 (forma corta, rs*CART*: *rat short CART*) y pro*CART* 1-102 (forma larga, r*CART*; *rat long CART*) (28); lo que no se observa en humanos, donde únicamente se tiene un RNAm que produce el péptido pro*CART* 1-89 (39).

La edición del RNAm no tiene efecto sobre la función de *CART*, ya que la región que codifica para el péptido activo de *CART* se encuentra río abajo de la región donde se lleva a cabo (exón 2) (32, 39). La importancia de que existan las 2 variantes de *CART* en la rata y si su regulación es diferencial es desconocida, aunque se tienen reportes de que la expresión de la forma corta es la más abundante (28).



**Fig. 3.** Diagrama esquemático del gen *CART* y su región promotora. Los sitios de unión para factores de transcripción están indicados y el sitio del inicio de la transcripción está dado como +1 (39).

### 1.2.2 Regulación de *CART* sobre la homeostasis energética

La población de neuronas en el ARC que sintetiza péptidos anorexigénicos es aquella que expresa POMC/*CART* (los cuales co-localizan) (15). La expresión de estos péptidos se encuentra regulada por leptina e insulina, ya que estas neuronas contienen receptores a ellos (40, 41), concentraciones altas de leptina e insulina activan la expresión del RNAm de *POMC/CART* y la disminución de las mismas la inhibe (16, 42, 43). Por lo que se reconoce al ARC como el sitio más importante en la transducción de señales aferentes de la circulación periférica (leptina e insulina) en una respuesta neuronal (5).

Las neuronas POMC/*CART* del ARC tienen proyecciones hacia células de segundo orden, las cuales incluyen a diversos núcleos hipotalámicos, entre ellos al NPV, HL y el área perifornical (44, 45); éstas procesan información referente a la homeostasis energética y expresan a su vez neuropéptidos involucrados en la regulación de la

conducta alimentaria (3); como es el caso de CART, el cual se ha encontrado expresado en estas regiones (25).

Se ha demostrado que CART tiene efectos anorexigénicos por medio de su administración i.c.v. (46), y que en animales *knock out* (K.O.) de CART hay aumento en el peso corporal, alteración en la secreción de insulina (el transportador de glucosa en páncreas (GLUT-2) disminuye con la edad de los animales y la secreción de insulina inducida por glucosa baja), intolerancia a la glucosa y alteración en la morfología de las células beta del páncreas (47), por lo que la regulación de CART sobre la homeostasis energética se puede dar también por la interacción con otros factores.

### 1.3 Anorexia Nervosa

Los trastornos de la conducta alimentaria (TCA) son padecimientos que tienen serias consecuencias físicas, psicológicas y sociales. La anorexia tiene una prevalencia en la población mundial general que va de 0.5 a 1.5% (48, 49) y se presenta con una razón de prevalencia hombre/mujer de 1:6. Para el grupo de mujeres de 15 a 24 años de edad la incidencia se ha incrementado en los últimos 30 años ya que este es el grupo de la población más vulnerable (50). No existen datos sobre la prevalencia o incidencia de los TCA para población general en México, únicamente se sabe que la prevalencia de TCA en mujeres universitarias en 1995 era de 0.49% y para el año 2002 incrementó a 1.15% (51). También se ha detectado que 0.9% de los hombres y 2.8% de las mujeres (de 12 a 19 años), tienen alto riesgo de padecer algún TCA (51).

La anorexia nervosa es un desorden de etiología desconocida, aunque hay evidencias que sugieren la interacción de causas multifactoriales para su desarrollo, como factores genéticos, biológicos, psicológicos y socioculturales que contribuyen significativamente a la susceptibilidad de padecerla; aunque un factor por sí sólo no ha mostrado ser necesario o suficiente para manifestar el desorden (4, 52, 53). Se caracteriza por distorsión de la imagen corporal, alteraciones en la conducta alimentaria (restricción de alimentos, ayuno, entre otras) pérdida del apetito y reducción del consumo alimentario aún en presencia de fuentes alimentarias (54). Esto tiene como consecuencia una importante desnutrición y pérdida de peso dramática (4, 55, 56). La conducta aberrante de falta de apetito subyace a otros padecimientos psiquiátricos como el trastorno obsesivo compulsivo (TOC), depresión y/o ansiedad, lo que evidencia que la anorexia no suele ser un trastorno primario (57).

De acuerdo a la Asociación Americana de Psiquiatría (58) los criterios diagnósticos para la Anorexia Nervosa son:

- Rechazo a mantener el peso corporal igual o por encima del valor mínimo normal considerando la edad y la estatura.
- Miedo intenso a ganar peso o convertirse en obeso, incluso estando por debajo del peso normal.
- Alteración de la percepción del peso o la silueta corporales, exageración de su importancia en la autoevaluación o negación del peligro que representa el bajo peso corporal.

- En mujeres postpuberales, presencia de amenorrea (ausencia consecutiva de al menos tres ciclos menstruales).

De acuerdo a la presencia o no de síntomas bulímicos, la anorexia se subdivide en restrictiva y compulsiva/purgativa.

La desnutrición que acompaña a la AN genera estrés y produce una pérdida de la regulación del eje HHA. El eje HHA es incapaz de adaptarse ante un estado de estrés crónico (disponibilidad de nutrientes disminuida y restricción alimentaria), manteniendo elevada la concentración de CRH; esta elevación prolongada favorece la pérdida de la homeostasis energética (59). Esto se debe a que la CRH tiene un efecto anorexigénico mediado por la leptina, ya que la administración i.c.v. de CRH o directamente en el NPV, inhibe la alimentación (10, 60, 61).

Los cambios endócrinos asociados a la AN en humanos arrojan evidencia de que existe disfunción hipotalámica, que es secundaria a la pérdida de peso y que puede ser revertida con la ganancia del mismo (52). Entre los cambios se encuentran el hipogonadismo, hipercortisolemia, resistencia a la hormona de crecimiento, hipoleptinemia y síndrome del eutiroideo enfermo (62-65). Este último se refiere a los pacientes que presentan contenido normal o disminuido de hormonas tiroideas (HT) y de tirotrópina (TSH), así como una alteración en la respuesta de la adenohipófisis de liberar TSH después de una inyección de TRH. Estos cambios sugieren que se presenta una respuesta adaptativa del eje HHT a la disminución de la disponibilidad de alimento, lo que disminuye el gasto energético (4, 52, 66, 67).

Se han estudiado los cambios endócrinos presentes en condiciones desfavorables de energía, tales como la baja disponibilidad nutricional y el ayuno, observándose una reducción en la actividad del eje HHT en ratas hembras y machos; se desarrolla hipotiroidismo terciario, caracterizado por la disminución en la expresión del RNAm de *pro-TRH* en NPV y en su liberación, a pesar de que la concentración sérica de las hormonas tiroideas está disminuida (68-72). Esto sugiere que el eje HHT disminuye su punto de control (set point) a nivel del hipotálamo. Se cree que las alteraciones en el eje HHT en la anorexia nervosa son de origen central, debido a la secreción reducida de TRH hipotalámico (67, 73).

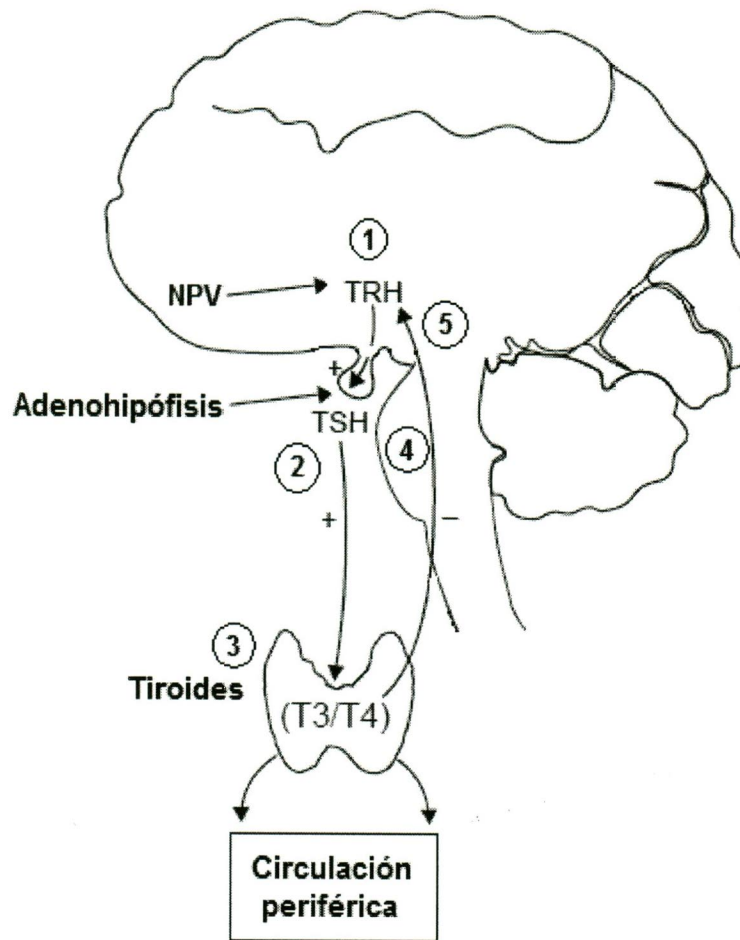
### *1.3.1 Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT)*

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es un tripéptido, cuya función más ampliamente descrita es la regulación del funcionamiento del eje HHT. Las neuronas TRHérgicas implicadas en esta regulación se denominan hipofisiotrópicas (74) y se localizan exclusivamente en las subdivisiones medial y periventricular parvocelular del NPV (75-77).

Los axones de estas neuronas proyectan hacia la zona externa de la eminencia media, donde TRH es secretado hacia la circulación portal (78); de esta manera, el péptido llega a sus células blanco en la adenohipófisis (79), donde uniéndose a sus receptores específicos (TRH-R1) (80) activa la síntesis y secreción de tirotrópina (TSH) de los tirótropos y de prolactina de los lactótropos (81-85).

La TSH liberada de la adenohipófisis, a su vez regula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (HT): triyodotironina ( $T_3$ ) y tiroxina ( $T_4$ ) de la glándula tiroides. Las HT regulan por retroalimentación negativa la síntesis y liberación de TSH en la adenohipófisis y de TRH en el NPV (Fig. 4) (86-88). Así, en condiciones de hipotiroidismo existe un aumento en la expresión de TRH y TSH, y en el hipertiroidismo en cambio se presenta una disminución de la síntesis y liberación de ambas hormonas.

Las hormonas tiroideas son moduladores importantes de la homeostasis energética a través de sus efectos en la termogénesis, de la regulación directa de la expresión de las proteínas desacopladoras (UCP) en las mitocondrias del tejido adiposo pardo, y de la estimulación de la lipólisis (19, 89).



**Fig. 4.** Diagrama del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). (1) Liberación de TRH desde el NPV del hipotálamo hacia la circulación portal. (2) Liberación de TSH desde la adenohipófisis hacia la circulación periférica. (3) Liberación de las HT desde la tiroides hacia la circulación periférica. (4) y (5) Retroalimentación negativa del eje HHT por medio de las HT (90).

#### 1.4 Modelos animales de anorexia

Los modelos animales son sistemas biológicos que pueden dar un acercamiento hacia una trastorno humano, sin que se puede observar el fenotipo completo que es diagnóstico para esa enfermedad o la causa primaria que causa la enfermedad. Su importancia radica en que aunque no presentan precisamente las mismas

características de la enfermedad, ofrecen una visión útil para la comprensión de la etiología de la enfermedad o de posibles blancos para el tratamiento de la misma (91).

Los modelos animales pueden ser espontáneos, donde los animales presentan de manera natural características parecidas a las que se presentan en humanos o en un estado de la enfermedad humana; también pueden ser inducidos, donde los animales son alterados ya sea por cirugía o manipulación genética. Los modelos espontáneos muestran como algunos factores, tales como la dieta, la genética y el ambiente, entre otros, pueden contribuir al desarrollo de una enfermedad; mientras que los inducidos estudian las causas subyacentes de la patología (91).

Para la validación de los modelos animales de trastornos psiquiátricos se han clasificado en dos tipos principales. El primer tipo son los modelos de ensayo, utilizados para probar fármacos potencialmente terapéuticos; la validación de éstos modelos está dada por la validez predictiva, la cual se refiere a la capacidad de predecir de manera confiable que un fármaco pertenece a una clase terapéutica y a la correlación entre la acción del fármaco en el modelo y en la clínica (92, 93).

El segundo tipo de modelos animales son los modelos de simulación, usados para investigar la fisiopatología de los desórdenes psiquiátricos; donde además del criterio de la validez predictiva se evalúan otros dos aspectos de la validez. Uno de estos es la validez aparente, la cual se refiere a las similitudes entre el modelo animal y el desorden psiquiátrico en los humanos; el otro aspecto es la validez de constructo que

se refiere a la semejanza entre la interpretación teórica del modelo y los conocimientos neurobiológicos que se poseen sobre el desorden psiquiátrico (92, 93).

Se han desarrollado diversos modelos animales encaminados al estudio de la anorexia, estos tratan de incluir los aspectos más representativos de la enfermedad en los humanos, como el inicio temprano de la enfermedad (adolescencia), predominancia en mujeres, disminución del consumo alimentario, disminución del peso corporal, depleción del tejido adiposo y muscular, función endócrina y neuroendocrina anormal, entre otros. Al presentarse la anorexia como un padecimiento secundario a algunas patologías psiquiátricas, como la depresión y ansiedad, su validación predictiva ha sido difícil, ya que el empleo de fármacos (antidepresivos, ansiolíticos) está enfocado a la causa primaria, que en este caso serían los trastornos psiquiátricos.

#### *1.4.1 Paradigma de Anorexia por Deshidratación*

Para estudiar los mecanismos involucrados en el desarrollo de una conducta de anorexia existen diferentes modelos animales que no están basados en la causa de la enfermedad, sino que tratan de imitar los aspectos más importantes del síndrome en los humanos (94); entre los que se encuentra el de anorexia por deshidratación (95). Este modelo nos permite observar las alteraciones generadas por el estrés a corto plazo, en donde se genera un cambio en la conducta alimentaria; pero sin llegar a ser un estrés crónico, ya que éste además de generar disminución en la ingestión de alimentos podría generar el aumento del mismo (96).

La deshidratación es un reto homeostático para el animal, que induce alteraciones endócrinas y conductuales. Para llevar a cabo la digestión se requiere una gran cantidad de agua, por lo que durante la deshidratación; la alimentación, la salivación y la motilidad gástrica e intestinal disminuyen; mientras que la retención de agua por los riñones y la conducta de búsqueda de agua aumenta. Esto es resultado del aumento de la concentración plasmática de vasopresina, la cual también ayuda a mantener la presión sanguínea (95, 97). Así mismo la disminución de la ingestión alimentaria durante la deshidratación reduce la osmolalidad sanguínea (95, 97, 98).

Las ratas consumen solución salina al 2.5% en lugar de agua y esto induce el desarrollo de la conducta anoréxica: después de 7 días los animales reducen el consumo de alimento hasta 85-90% y su peso en un 30% con respecto a los animales control (que consumen agua sola) (67, 73, 95, 99). A un tercer grupo de animales (con restricción alimentaria forzada, RA) se les ofrece una cantidad de alimento igual al consumido por los deshidratados, es decir su consumo está pareado al de los deshidratados. Sin embargo, los animales con RA si comerían si se les ofreciera alimento mientras que los deshidratados lo evitan aún teniendo la comida presente, lo que evidencia que la motivación por el consumo alimentario se encuentra alterada en los animales con anorexia por deshidratación (AN). En función de esto, el modelo es de utilidad para estudiar la motivación por el consumo de alimentos, que está alterada en los pacientes con anorexia nervosa, aunque la etiología sea diferente.

Estudios previos (67, 99) han mostrado los cambios hormonales y neuropeptidérgicos que se dan en la anorexia por deshidratación en ratas. Tanto las ratas AN como las

ratas RA (las cuales están pareadas al consumo de alimento de las ratas AN), presentan las mismas características endócrinas y neuropeptidérgicas: el aumento en la expresión del RNAm de *NPY*, disminución de la expresión del RNAm de *POMC* y de *neurotensina (NT)* en ARC; aumento en el contenido sérico de corticosterona y disminución de las concentraciones séricas de leptina, insulina y estradiol (en hembras). A pesar de que ambos grupos presentan estas alteraciones, sólo los animales AN presentan anorexia severa (disminución del peso corporal y del consumo de alimento); sugiriendo que otros componentes de la red neuronal que regulan la homeostasis energética, podrían estar involucrados en el desarrollo de la conducta anoréxica.

Se ha reportado que en animales sometidos a ayuno o a restricción alimentaria, la expresión del RNAm de *pro-TRH* en NPV disminuye (69, 70), para facilitar el ajuste del punto de control del eje HHT ante la baja disponibilidad energética y mantener las reservas energéticas (72). Esta disminución también se observa en animales RA aunado a otros cambios relacionados como la menor liberación de TRH de la eminencia media, lo que se evidencia por el incremento en contenido del péptido medido por radioinmunoensayo (RIA) y por la menor concentración sérica de TSH en estos animales (67, 88).

En el grupo AN los animales son incapaces de adaptar el eje HHT a nivel hipotalámico, lo que se confirma por el aumento de la expresión del RNAm de *pro-TRH* en NPV (67); ahora se conoce que el aumento de *TRH* se da específicamente en las regiones anterior y posterior del NPV (NPVa, NPVp) (100) donde las neuronas TRHérgicas del NPVa no realizan funciones hipofisiotrópicas y probablemente participen en la

regulación de la homeostasis energética (101); y donde las neuronas TRHérgicas del NPVp cumplen funciones hipofisiotrópicas, regulando al eje HHT (76, 77, 102). El aumento en la expresión de *pro-TRH* en el NPVa y NPVp de animales AN puede estar relacionado con las alteraciones en la conducta alimentaria y la desregulación del eje HHT observada en animales AN; aunque no es el único factor involucrado en la aparición de la conducta de anorexia, ya que se han encontrado alteraciones en la expresión de otros genes relacionados a esto. Entre éstos se encuentran el aumento en la expresión del RNAm de *CRH* en HL (99) de animales AN, el cual se propone como un péptido que genera anorexia en la deshidratación y anticipa el inicio de esta conducta, ya que únicamente los animales deshidratados que presentan la expresión elevada del RNAm de *CRH* desarrollan anorexia y la cantidad del RNAm de *CRH* está correlacionada significativamente con la intensidad de la anorexia (95).

También se ha reportado la disminución del RNAm del *receptor de CRH (CRH-R2)* en NPV, sugiriendo que el aumento del RNAm de *CRH* en HL afecta la expresión de su receptor (*CRH-R2*) en NPV (73). Por otra parte, en estudios donde se ha bloqueado la señalización de *CRH* del HL hacia el NPV por medio de un antagonista específico (antisauvagina-30, ASG-30) (73), se ha observado que todas las alteraciones del eje HHT de animales AN (aumento de la expresión de *pro-TRH* en NPV, disminución de la expresión del RNAm del *receptor de TRH (TRH-R1)* en adenohipófisis, aumento de la concentración sérica de TSH) se revierten, induciendo la adaptación del eje HHT que se observa en condiciones de balance energético negativo (menor consumo de alimento y mayor gasto de energía). Aunque la administración de ASG-30 atenúa, pero no revierte la conducta de anorexia desarrollada por animales AN, ni la ganancia de peso (73); por

lo que es razonable suponer que otros factores y redes neuronales podrían estar interactuando para favorecer las alteraciones de la conducta alimentaria en los animales con anorexia por deshidratación.

De hecho, se ha investigado la expresión hipotalámica de algunos neuropéptidos y sus receptores, involucrados en la regulación de la homeostasis energética. Tal es el caso de la vía orexinérgica, donde se ha reportado que la expresión del RNAm de *prepro-orexinas* no aumenta en animales AN, como se observa en el grupo RA, sugiriendo que ésta inactivación de las neuronas del HL esté relacionada con la conducta anoréxica de ratas AN (103). También se ha estudiado la vía NPYérgica y la de la leptina, donde se ha encontrado que tanto los animales RA como los AN tienen expresión similar del RNAm de *NPY* en ARC (99), aunque la expresión del receptor *NPY-Y1* en NPV no disminuye en animales AN en respuesta al aumento de NPY a diferencia de los RA, lo que podría sugerir que hay una resistencia al efecto orexigénico de NPY, facilitando la aparición de la conducta de anorexia en animales deshidratados y la falta de inhibición de NPY sobre la expresión de *TRH*. Así mismo el receptor de leptina (*Ob-Rb*) en NPV de animales AN no aumenta en respuesta a la baja concentración sérica de leptina, como se observa en animales RA, lo que podría sugerir que está siendo activado por la leptina y a su vez generar una respuesta anorexigénica relacionada con la alteración de la conducta alimentaria de los animales AN (103).

Por otra parte, el aumento en la expresión de *pro-TRH* y de la concentración sérica de TSH en los animales AN, aunado a la disminución del contenido sérico de las HT,

muestran el desarrollo de hipotiroidismo primario, en lugar del terciario característico de los animales con restricción alimentaria forzada (67, 73).

Las neuronas TRHérgicas del NPV son algunas de las células más afectadas por la AN, aunque no se descarta que otras células de otras regiones cerebrales puedan estar involucradas como lo son la corteza insular, el septum (104, 105), ARC y las neuronas TRHérgicas del HL, ya que se ha encontrado un contenido (medido por radioinmunoensayo, RIA) y expresión del RNAm diferencial de *TRH* en estas regiones entre el grupo de RA y el de AN en el modelo de anorexia por deshidratación (73). Esto es importante debido a que a TRH se le ha asociado con funciones anorexigénicas, porque su inyección i.c.v. reduce el consumo alimentario (106-108) y las neuronas que lo sintetizan en NPV (diferentes a las hipofisiotrópicas) pueden tener proyecciones hacia otras áreas cerebrales que también estarían controlando la motivación por el consumo de alimentos (101). Esto promovería el desarrollo de la conducta anoréxica en los animales AN.

Utilizando el modelo de anorexia por deshidratación, se ha semi-cuantificado la expresión de *CART* en el NPV y en ARC por medio de RT-PCR, en donde se ha encontrado disminución de *CART* en ambos núcleos (109). No se ha descrito si esta disminución se da en la misma región en donde hay aumento de la expresión del RNAm de *pro-TRH* (NPVa, NPVp), lo que sería importante describir. Esto es porque al sintetizarse TRH y *CART* en las mismas neuronas del NPV, sería factible que los mismos estímulos que afectan la expresión de TRH, afecten la de *CART*, como lo es la anorexia por deshidratación. Tampoco se han estudiado los cambios en la expresión

del RNAm de *CART* por hibridación *in situ* (ISH) en ARC o en HL, y dado que ARC es un núcleo hipotalámico altamente relacionado con la regulación de la conducta alimentaria, creemos necesaria la descripción de la expresión del RNAm de *CART* por técnicas de histoquímica como la hibridación *in situ*. De la misma manera, el HL es un núcleo hipotalámico relacionado con la regulación de la conducta alimentaria, y con el aumento de la expresión del RNAm de *pro-TRH* (67, 103); se han encontrado alteraciones en las vías de diversos neuropéptidos del HL en animales AN (orexinas, CRH, TRH), por lo que *CART* sintetizado en el HL podría estar relacionado con la aparición de la conducta de anorexia en animales AN (98).

#### 1.4.2 Paradigma Cepa Wistar Kyoto

La cepa Wistar Kyoto (WKY), la cual surgió a partir de ratas Wistar, como el control normotenso de ratas espontáneamente hipertensas (SHT) en 1963 (110), son animales hiper-reactivos al estrés (111) y presentan alteraciones en los ejes HHA y HHT (112). Los animales WKY presentan incrementada la concentración sérica de TSH y de T<sub>3</sub>, mientras que la de T<sub>4</sub> se encuentra normal. Además, a pesar de que la concentración de T<sub>3</sub> se encuentra aumentada, la expresión de *pro-TRH* en el hipotálamo es normal (113). En cuanto al eje HHA, los animales WKY presentan concentraciones plasmáticas basales elevadas de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y de corticosterona (114); así como incremento en la expresión del RNAm de *POMC* en la adenohipófisis, el cual es el precursor de ACTH, y una respuesta exagerada de ACTH en plasma frente a retos de estrés agudo y crónico (111, 115).

Aunque no hay estudios donde se utilice a los animales Wistar Kyoto como un modelo de anorexia, en este trabajo se propone que así podría ser debido a diversas alteraciones que presentan; entre éstas se encuentran que su consumo alimentario y su peso corporal en condiciones basales es menor al de ratas Wistar (wild type) de la misma edad y sexo. Sin embargo, no se conocen los mecanismos a los que se deba este fenómeno. Por estas razones se propone que la cepa Wistar Kyoto podría constituir un modelo “natural” de la enfermedad, ya que además de las alteraciones en el peso corporal y el consumo de alimento, la mayoría de los pacientes con anorexia presentan alteraciones en los ejes HHA y HHT (Tabla 2). Además de que se ha reportado que los animales WKY pueden ser utilizados como modelos de depresión y ansiedad (112, 116), trastornos que también se presentan con frecuencia en los pacientes con anorexia nervosa (57).

No se ha estudiado la expresión de CART en animales WKY, por lo que resulta importante describir el patrón de expresión en el NPV, ARC e HL, debido a que son núcleos involucrados en la regulación de la conducta alimentaria.

**Tabla 2.** Cambios metabólicos que se presentan en pacientes con Anorexia Nervosa, en el modelo animal de anorexia por deshidratación y en la cepa Wistar Kyoto.

Parámetro	Pacientes con Anorexia Nervosa	Anorexia por deshidratación	Cepa Wistar Kyoto
Peso corporal	↓	↓	↓
Consumo de alimento	↓	↓	↓
Conc. sérica de corticosterona	↑	↑	↑
Conc. sérica de HT	↓	↓	↑
Conc. sérica de TSH	= / ↓	↑	↑
Conc. sérica de leptina	↓	↓	↓

## II. Objetivos

### 2.1 Objetivo General

Caracterizar a la cepa Wistar Kyoto como un modelo de anorexia y definir la participación de CART del HL, NPV y ARC del hipotálamo de ratas macho en el fenotipo de anorexia en dos modelos de anorexia.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar los cambios en la expresión del gen *CART* en las neuronas del NPV, HL y ARC del hipotálamo en animales sometidos a anorexia por deshidratación.
- Determinar los cambios en la expresión del gen *CART* en las neuronas del NPV, HL y ARC del hipotálamo en ratas Wistar Kyoto.
- Comparar los cambios en la expresión del gen *CART* en las neuronas del NPV, HL y ARC del hipotálamo entre animales sometidos a anorexia por deshidratación y ratas Wistar Kyoto.

### III. Estrategia experimental

#### 3.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar (24 machos) para el paradigma de anorexia por deshidratación con un peso promedio de 250 g al inicio del experimento; para el experimento de la cepa Wistar Kyoto se utilizaron ratas Wistar (20 machos) y ratas Wistar Kyoto (20 machos) en edad adulta (2 meses de edad) del Bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" (RFM). Fueron mantenidas en cajas individuales en condiciones controladas de 12 h de luz-oscuridad (luz de 6:30 a 18:30 hrs) y temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , con acceso ilimitado al alimento (Rodent Laboratory Chow 5001, PMI, Minnesota) y agua durante la semana previa al inicio del experimento para adaptación de los animales.

#### 3.2 Experimentos

##### 3.2.1 Experimento Anorexia por deshidratación

El experimento tuvo una duración de siete días y se formaron tres grupos. El experimento se repitió bajo las mismas condiciones con otro lote de animales en una fecha posterior para la validación de los resultados. Los grupos que se formaron fueron los siguientes:

1. Control (C): consumo de alimento y agua *ad libitum*.
2. Grupo de anorexia (AN): consumo de alimento *ad libitum* y solución salina al 2.5% como líquido de bebida (95).

3. Grupo de restricción alimentaria (RA): consumo de agua *ad libitum* y misma cantidad de alimento que consumió en promedio el grupo de anorexia el día anterior. El consumo de alimento se calcula por diferencia de peso entre la cantidad que se ofrece y lo que no consumen en 24 h.

### 3.2.2 Experimento Cepa Wistar Kyoto

El experimento tuvo una duración de siete días y se formaron 2 grupos. El experimento se repitió bajo las mismas condiciones, con otro grupo de animales en una fecha posterior para la validación de los resultados. Los grupos que se formaron fueron los siguientes:

1. Control (CW): animales Wistar wild type, con consumo de alimento y agua *ad libitum*.
2. Grupo de anorexia (WKY): animales Wistar Kyoto de la misma edad que los CW, con consumo de alimento y agua *ad libitum*.

A todos los grupos de ambos experimentos se les proporcionaron 50 g de alimento (excepto al de RA) y 150 ml de líquido de bebida por día. Los animales se pesaron diariamente entre las 9:00 y 11:00 h y se alimentaron hasta el día del sacrificio (día 7), también se registraron diariamente el consumo de alimento y líquido. Todas las dietas y procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y la Comisión de Proyectos del Instituto Nacional de Psiquiatría "RFM" (No. de proyecto NC093270.1).

Todos los animales (de ambos paradigmas) fueron sacrificados por decapitación, entre las 10:00 y 12:00 h del día 7 del experimento, se extrajo el cerebro y se guardó a -70°C

hasta su utilización. Se realiza al día 7, ya que estudiando la cinética de cambios a los días 1, 3, 5 y 7 se ha encontrado que los cambios en la expresión de péptidos y en la concentración de hormonas son más evidentes hasta el día 7 (109). También se obtuvo el tejido adiposo abdominal (blanco, WAT) y el tejido adiposo subescapular (pardo, BAT) de animales WKY y se pesó, con la finalidad de correlacionarlo con la concentración sérica de leptina y verificar la disminución del tejido adiposo, a la par del peso corporal. Únicamente se realizó en animales WKY ya que anteriormente se había realizado en el paradigma de anorexia por deshidratación (67). Los cerebros congelados (-20°C) se cortaron en rebanadas de 14 micras que incluyeron al NPV, el HL y el ARC utilizando un criostato (Microm HM 525, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), (coordenada -1.08 a 3 mm de Bregma) (117), para efectuar un análisis de la expresión del gen *CART* por medio de histoquímica por hibridación *in situ*. Se procesaron 3 rebanadas anteriores, 3 medias y 3 posteriores de cada animal, para promediar los resultados y considerar el promedio como 1 sola medición por animal/nivel.

Los cerebros (n= 6/grupo) del experimento Cepa Wistar Kyoto que se utilizaron para la semicuantificación de la expresión del RNAm de *CART* y *TRH* por RT-PCR se disecaron utilizando el criostato (Microm HM 525, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para llegar a la región que contuviera el NPV, el HL y el ARC (H 7.2 a 8.2 mm; L - 0.5 a 0.5 mm) (117), obteniéndose con un sacabocado de 1 mm de diámetro. Únicamente se realizó en animales WKY, ya que la determinación de la expresión de *CART* y *TRH* ya se ha hecho con anterioridad en el modelo de anorexia por deshidratación (103, 109). Se colectó la sangre troncal de cada rata y se separó el

suero, para la posterior cuantificación de hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ), TSH y corticosterona por radioinmunoensayo (RIA) y leptina por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las concentraciones séricas de  $T_4$  y corticosterona únicamente se midieron en el paradigma de anorexia por deshidratación, ya que la muestra de los animales de la cepa Wistar Kyoto fue insuficiente.

## **IV. Metodología**

### **4.1 Extracción de RNA total**

Se extrajo el RNA total de cada región (NPV, HL y ARC) por medio del método de tiocianato de guanidina el cual consiste en desnaturalizar a las ribonucleasas por la acción del tiocianato de guanidina, eliminación de lípidos por el cloroformo y la eliminación de proteínas por medio del fenol.

El protocolo que se siguió fue el descrito por Chomczynski (118). Se preparó la solución desnaturalizante (solución D) con tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25mM pH 7.0, sarcosil al 0.5% y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1M. Se homogeneizó el tejido en la solución D (0.1 g tejido/ml solución D) con ayuda del sonicador (Vibra Cell, Sonics, Connecticut), se agregó un volumen del homogenado de fenol saturado en agua, 1/10 del volumen de acetato de sodio 2M pH 4.0 y 0.2 del volumen de cloroformo isoamílico 24:1 v/v y se dejó reposar por 15 minutos en hielo; posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 20 minutos a 4°C, se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de isopropanol y se dejó reposar a -20°C por 24 horas. Transcurridas las 24 horas se centrifugó a 14 000

rpm por 30 minutos a 4°C, se decantó, lavó 3 veces con un volumen del homogenado de etanol al 75% y se centrifugó a 14 000 rpm por 12 minutos a 4°C. Al término de los lavados se decantó y secó en el savant (Vacufuge, Eppendorf, Hamburgo) por 4 minutos. Para verificar la cantidad y la pureza del RNA extraído se cuantificaron 2 µl de muestra en el espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburgo) tomando las absorbancias a 230nm, 260nm y 280nm y las proporciones de absorbancia (260/230, 260/280), siendo 230nm el valor referido a las sales minerales, 260nm al RNA y 280nm a las proteínas. Si los valores de las relaciones 260/230 y 260/280 fueron menores a 1.5 fue indicativo que la muestra contuvo una gran cantidad de sales y/o de proteínas, por lo que se procedió a lavar la muestra nuevamente. Para esto se agregó a la muestra 1/20 del volumen de acetato de sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto, se dejó reposar 24 horas a 4°C, se centrifugó para precipitar el RNA y posteriormente se procedió a lavar con etanol al 75% como se describió previamente.

#### *4.1.1 Integridad del RNA total*

Para verificar la integridad del RNA que se extrajo, se preparó un gel de agarosa al 1%. Se preparó el gel con agarosa, TBE 5x y agua Milli Q estéril, a las muestras se les agregó colorante y se vertieron en el gel solidificado, se programó la fuente de poder (Electrophoresis power supply, ISCO, Nebraska) para aplicar el campo eléctrico en 100-110 volts por 60 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, el gel se transfirió a un tanque con bromuro de etidio y se tiñó de 3 a 5 minutos, después se transfirió al agua y se enjuagó por 8 minutos aproximadamente. Al terminar, el gel se colocó en la cámara de luz UV (Transilluminator M-20, UVP, California) y se tomó una fotografía. Para determinar la integridad del RNA se utilizó un densitómetro (2-D Advanced, Advanced

American Biotechnology, California) y se evaluó la relación entre la densidad de la banda 28s y 18s del RNA; si la relación fue mayor a 1.5 se consideró que el RNA estuvo en óptimas condiciones para su utilización.

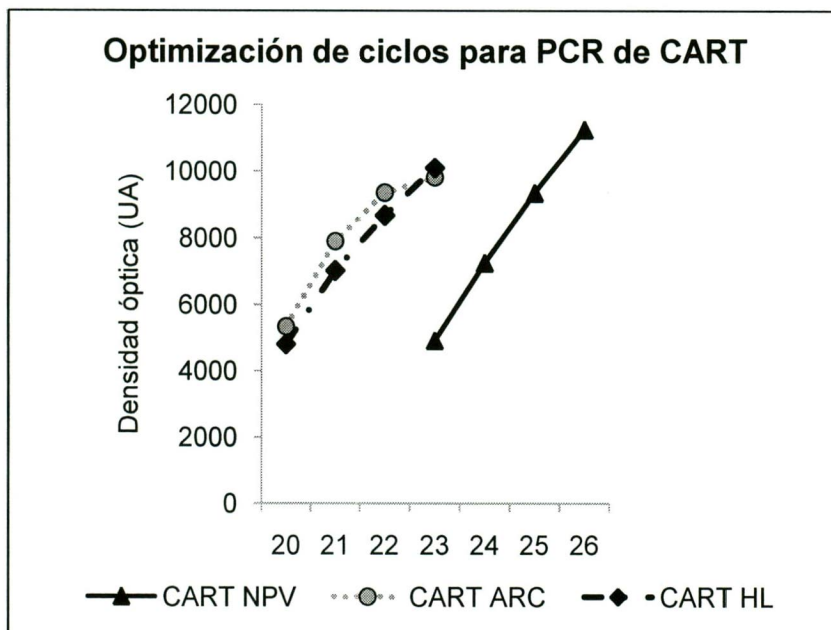
## 4.2 Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Este procedimiento permite la amplificación de moléculas de RNA con gran especificidad, mediante la transcripción reversa del RNA a cDNA, que es posteriormente amplificado. Para la mezcla de la transcripción reversa se utilizó agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), Buffer RT 5x (Gibco BRL, Nueva York), ditiotreitól (DTT) 0.1M 10x, dNTPs 10mM, oligo dT 0.5 µg/µl y transcriptasa reversa (RT) (Gibco BRL, Nueva York) 200 U/µl. A 20 µl de mezcla se agregaron 12 µl (2 µg) de RNA para la transcripción y se incubaron las muestras a 37°C durante 2 horas (Baño Lauda E100, Brinkmann Instruments Inc., Nueva York).

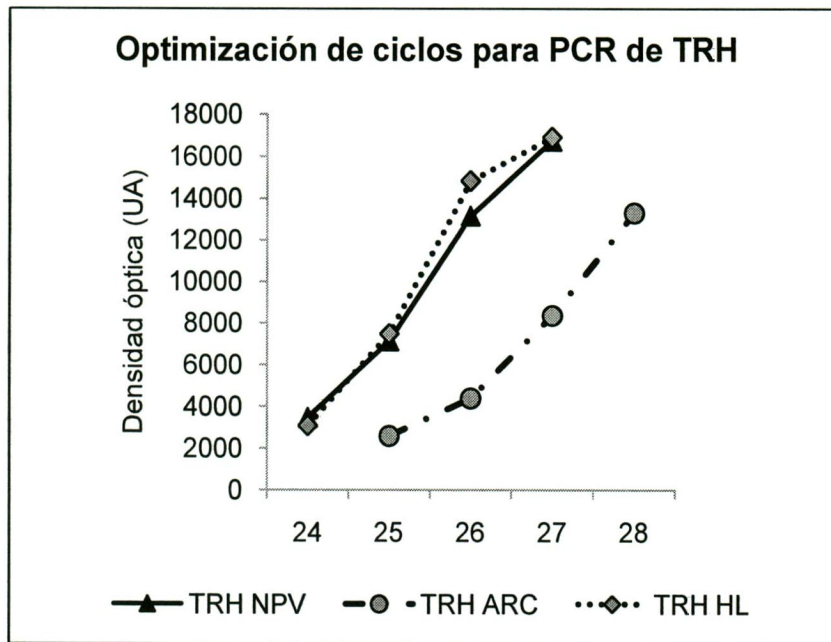
Para la mezcla de la PCR se utilizó agua bidestilada estéril tratada con DEPC, Buffer para la Taq DNA polimerasa 10x, dNTPs 10mM, oligonucleótido sentido y antisentido (*pro-TRH* sentido: 5'-GCA CCT TGG TTG CTG TCG ACT CTG GCT TTG-3', antisentido: 5'-ATG ACT CCT GCT CAG GTC ATC TAG AAG CT-3' (119); *CART* sentido: 5'-GCC AAG TCC CCA TGT GTG AC-3', antisentido: 5'-CAC CCC TTC ACA AGC ACT TCA-3' (120); *Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3-PDH)* sentido: 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3', antisentido: 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' (67), Taq DNA polimerasa 5 U/µl y cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>)

1.5 mM. Se vertieron 46  $\mu$ l de mezcla en un tubo y después se agregaron 4  $\mu$ l de cDNA de la muestra, se colocaron en el termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburgo) con las condiciones correspondientes (Tabla 3). Cada ciclo consistió de 1 min a 95°C seguido de 1 min a la temperatura media de cada oligonucleótido y 1 minuto a 72°C, por último todos los cDNA's tuvieron una extensión final de 10 min a 72°C. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

El número de ciclos para cada sonda fue optimizado para cada región para garantizar condiciones lineales y observar cambios en la expresión de genes, si es que éstos ocurren (Fig. 5 y 6); además de realizarse gradientes de temperatura.



**Fig. 5.** Optimización metodológica de la técnica RT-PCR para CART. Número de ciclos necesarios para amplificar cada cDNA. Los datos son la densidad óptica (unidades arbitrarias) del cDNA de cada producto de PCR obtenido a diferentes ciclos de amplificación.



**Fig. 6.** Optimización metodológica de la técnica RT-PCR para TRH. Número de ciclos necesarios para amplificar cada cDNA. Los datos son la densidad óptica (unidades arbitrarias) del cDNA de cada producto de PCR obtenido a diferentes ciclos de amplificación.

**Tabla 3.** Condiciones para PCR de los oligonucleótidos de estudio.

Oligonucleótido	Temperatura media (°C)	Ciclos	Concentración del oligonucleótido (pmol)	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>NPV</i>				
TRH	64	24	25	600
CART	64	24	25	190
G3-PDH	55	21	50	900
<i>HL</i>				
TRH	64	24	25	600
CART	64	21	25	190
G3-PDH	55	21	50	900
<i>ARC</i>				
TRH	64	26	25	600
CART	64	21	25	190
G3-PDH	55	21	50	900

#### 4.2.1 Análisis semi-cuantitativo de la expresión del RNAm de CART.

Este gel de agarosa es utilizado para observar la concentración de los productos de PCR. El procedimiento para llevarlo a cabo es igual al del gel de electroforesis al 1%, el único cambio es la concentración del gel de agarosa, la cual es al 2%. La cantidad relativa de los cDNA's estudiados se calcularon como la relación de la densidad óptica (medida en un densitómetro 2-D Advanced, Advanced American Biotechnology, California) de cada cDNA sobre la del gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G<sub>3</sub>PDH), éste se utiliza como gen control, ya que su expresión es constitutiva.

### 4.3 Radioinmunoensayos (RIA's)

#### 4.3.1 RIA de Tirotropina (TSH)

Para la cuantificación sérica de TSH se siguió el protocolo de la NIDDK (National Hormone and Pituitary Program). En tubos marcados de vidrio de 12 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 cuentas totales) se le agregaron 100 µl de anti-TSH de conejo y 100 µl de <sup>125</sup>I-TSH (7 000 cpm/tubo) y se mezclaron con el vórtex. Se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se agregó a cada tubo 1 ml de polietilenglicol (0.04 g de PEG/ml buffer RIA) y se mezclaron con el vórtex (Vortex Genie 2, Daigger, Illinois, USA). Se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se aspiró el sobrenadante y se contó el residuo en un contador gamma (LKB 1275 Minigamma, Finlandia).

#### 4.3.2 RIA de Hormonas Tiroideas (Triyodotironina ( $T_3$ ) y Tiroxina ( $T_4$ )) y de Corticosterona en suero

La cuantificación de  $T_3$  en suero se realizó con un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo  $^{125}\text{I}$  de fase sólida Coat-A-Count Total T3 DPC®:TKT31, Los Angeles CA, USA) diseñado para la determinación cuantitativa de triyodotironina total circulante ( $T_3$ ). Para la cuantificación de  $T_4$  en suero se utilizó un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo  $^{125}\text{I}$  de fase sólida Coat-A-Count Total T4 DPC®:TKT41, Los Angeles CA, USA) diseñado para la medición cuantitativa de la tiroxina circulante total ( $T_4$ ) en suero. La cuantificación de corticosterona en suero se realizó con un kit comercial (Kit de radioinmunoensayo  $^{125}\text{I}$  de fase sólida Coat-A-Count Rat Corticosterone DPC®:TKRC1, Los Angeles CA, USA) diseñado para la determinación cuantitativa de corticosterona en suero de ratas.

Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Se marcaron cuatro tubos de polipropileno de 12 x 75 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) para las HT; y la curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 2000 ng/ml utilizando 16 tubos recubiertos con anticuerpo, marcados con A (unión máxima) y con B a H (para el resto de los calibradores) para corticosterona. Las muestras del suero de

rata se midieron por duplicado. Para T<sub>3</sub> se depositaron 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; para T<sub>4</sub> se utilizaron 25 µl y para corticosterona 50 µl. Para T<sub>3</sub> se agregó 1.0 ml de <sup>125</sup>I T<sub>3</sub> total, para T<sub>4</sub> 1.0 ml de <sup>125</sup>I T<sub>4</sub> total y para corticosterona 1.0 ml de Corticosterona <sup>125</sup>I 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 (HT) o dos horas a temperatura ambiente (corticosterona). Se decantaron completamente, aspirando su contenido (excepto los tubos T). Se contaron durante 1 minuto en el contador gamma (LKB 1275 Minigamma, Finlandia).

#### 4.3.3 Cálculo de resultados de los RIA's

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 y de las muestras. Los valores de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en suero se expresan en ng/dl, y los valores de TSH y de corticosterona en suero se expresan en ng/ml.

#### 4.4 Cuantificación de la concentración sérica de leptina por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La cuantificación de leptina en suero se realizó con un kit comercial (Kit de EIA para leptina de rata Assay Designs, Ann Arbor, Michigan, USA) diseñado para la determinación cuantitativa de leptina total circulante.

Todos los componentes se llevaron a temperatura ambiente antes de su uso. Se realizó una curva de calibración por duplicado con concentraciones crecientes desde 0 hasta 6400 pg/ml utilizando los pocillos recubiertos con anticuerpo anti-leptina de la placa de EIA destinados para tal efecto. Las muestras del suero de rata también se midieron por duplicado, diluidas en buffer de ensayo en una relación 1:4. Se depositaron 100 µl del buffer de ensayo (S0: estándar 0) y de los estándares de la curva de calibración al fondo de cada pocillo correspondiente, así como 100 µl de cada muestra diluida. Se selló la placa y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Una vez transcurrido el tiempo se vaciaron y se lavaron los pocillos 3 veces añadiendo 400 µl de buffer de lavado a cada uno. Se añadieron 100 µl del anticuerpo anti-leptina biotinilado en cada pocillo excepto en el blanco (S0). Se selló la placa y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación. Al término de la incubación se lavó como anteriormente se explicó. Se le agregaron 100 µl de la solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa a cada pocillo excepto a S0. Se selló la placa y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se lavó como se describió anteriormente. Se añadieron 100 µl de la solución del sustrato (TMB: tetrametilbenzidina) de la peroxidasa a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a

temperatura ambiente con agitación. Se le agregaron 100 µl de la solución para detener la reacción (solución 1N de ácido clorhídrico, HCl) a cada pocillo. Se midió la densidad óptica (OD) del colorante a una longitud de onda de 450 nm, se calculó el promedio de la OD de S0 y se le restó al promedio de la curva de calibración. Se calculó la concentración de cada muestra interpolando los valores de OD en una gráfica lineal utilizando la curva de calibración. Los valores fueron ajustados a la dilución (1:4). La concentración se expresa en pg/ml.

#### 4.5 Análisis de la expresión del gen *CART* por medio de histoquímica por hibridación *in situ*

##### 4.5.1 Diseño de sondas para hibridación *in situ*

Se realizó el diseño de las sondas de *CART* con un tamaño de 50 nucleótidos, porcentaje de GC de 45 a 60% y las secuencias se analizaron en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para la búsqueda de secuencias con las que podrían hibridar las sondas; al final se analizaron las secuencias en el software oligo calc (versión 3.25) para la búsqueda de posibles formaciones de estructuras secundarias. Las secuencias de los oligonucleótidos dirigidos contra el RNAm de *CART* son: *CART1*) 5'-TCCTTCTCATGGGACGCATCATCCACGGCAGAGTAGATGTCCAGGGCTCG-3',  
*CART2*) 5'-ATCGGAATGCGTTTACTCTTGAGCTTCTTCAGGACTTCCTGCAGCGCT-3',  
*CART3*) 5'-CTTTCCGCACTGCGCACGCTCTCCAGCGTCACACATGGGGACTTGGCCG-3',  
*CART4*) 5'-CTTCAAGAGGAAAGAATTGCAAGAAGTTCCTCGGGGACAGTCACACAGCT-3',

GGACAAAAGAGCGCTCCTTTAGGGGAAAGAGGAAATATGGGAACCGAAGG-3'.

#### 4.5.2 Fijación de los tejidos para hibridación *in situ*

Los cortes cerebrales se montaron en laminillas cargadas eléctricamente sin tratamiento y se guardaron en cajas de disección a -20°C hasta su uso. Previo a la hibridación, las laminillas se secaron bajo una corriente de aire frío, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% a 4°C, se lavaron con PBS 3x y PBS 1x. Se trataron con pronasa y con glicina y posteriormente se lavaron nuevamente con PBS1x; para finalizar se deshidrataron los tejidos con etanol al 70 y al 100%.

#### 4.5.3 Hibridación *in situ*

Se realizó el marcaje de las sondas de CART con radioactividad (<sup>35</sup>S) por medio de la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT). Los tejidos fijados fueron cubiertos con buffer de hibridación (formamida al 50%, solución Denhardt's 1x, sarcosil 1%, buffer de fosfatos 20mM, RNAt de levadura, DNA de esperma de salmón, DTT 5M y sonda marcada) y mantenidos a 42°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tejidos se lavaron 4 veces con buffer de lavado (NaCl 0.6M, TRIS-HCl 10mM pH 7.5) a 60°C. Se deshidrataron los tejidos nuevamente con etanol al 70% y al 100%. Se colocaron en cassettes para films (Kodak) y se guardaron a temperatura ambiente (TA) durante 5-7 días. Se reveló el film y se observaron a través de un transiluminador de luz blanca. Se expusieron los tejidos a emulsión fotográfica (Kodak NTB) durante 30 días a 4°C. Una vez transcurrido el tiempo se revelaron las laminillas emulsionadas con revelador D-19 (Kodak). Se deshidrataron los tejidos en etanol al

50%, 70%, 80%, 95% y 100%, posteriormente se sumergieron en xilol y se montaron los tejidos utilizando la resina sintética para microscopía Entellan (Merck, Alemania) y se dejaron secar durante 2 días. Se limpiaron las laminillas con etanol absoluto y se observaron en el microscopio para el análisis de los resultados.

#### *4.5.4 Análisis de resultados de la hibridación in situ*

Para la cuantificación de la señal radioactiva de  $^{35}\text{S}$ -CART, se realizó un análisis cualitativo, visualizando y capturando la imagen en campo oscuro con una cámara Evolution MP Color (Media Cybernetics, USA) acoplada al microscopio Olympus BH2-RFCA, Japón) y analizada con el software Image-Pro Versión 4.1 (Media Cybernetics, USA). Se midió la suma de la densidad óptica integrada (IOD, pixeles/área) y se les restó el blanco. El blanco se obtiene midiendo la suma del IOD de una zona de la rebanada hibridada que no presenta señal positiva radioactiva. Se analizaron 3 rebanadas anteriores, 3 medias y 3 posteriores de cada animal. Se calculó el promedio de los valores de la suma de la IOD de las rebanadas/zona/animal y se consideró como una sola determinación, Anorexia por deshidratación n=8/grupo, cepa Wistar Kyoto n=10/grupo.

#### **4.6 Análisis estadístico de resultados**

Se calculó la media y el error estándar de la media (E.E.M) para todos los datos. Para realizar comparaciones entre los grupos se realizó una prueba de normalidad, seguida de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar datos bioquímicos (hormonas, expresión de genes) entre grupos de animales sacrificados el día 7; y

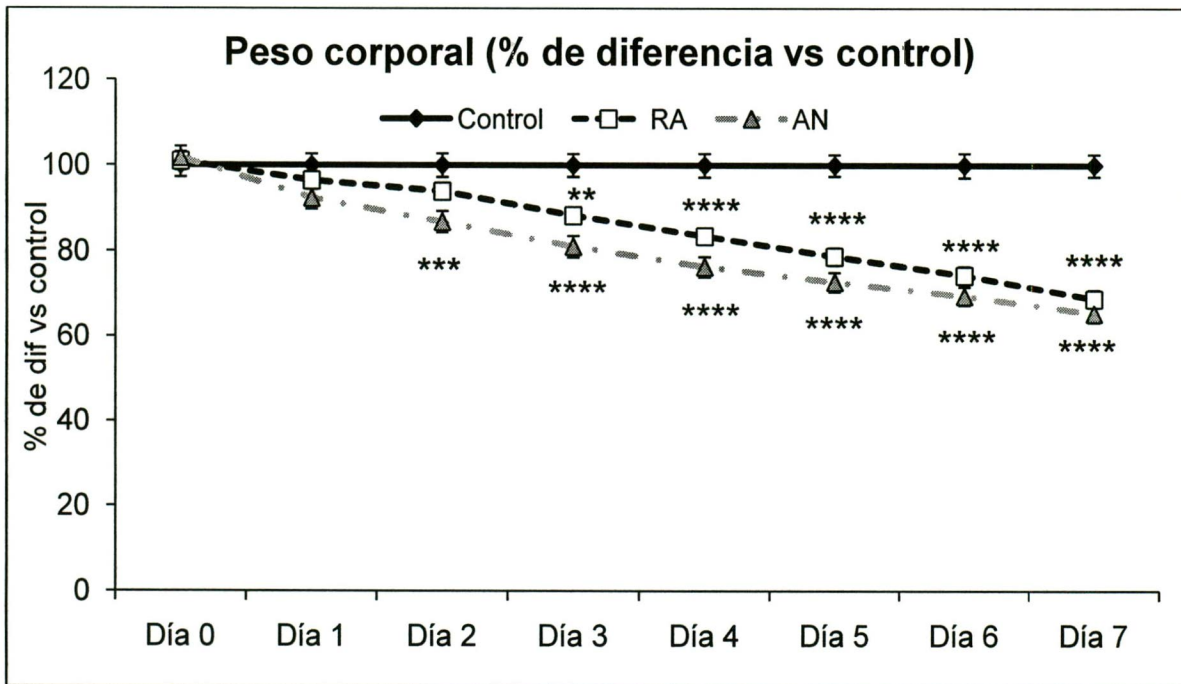
ANOVA de dos vías para comparar los cambios en el peso corporal, consumo de alimento y de líquido, así como la expresión de CART entre los diferentes grupos y cepas, seguido por la prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn (Software Stat View, versión 4.57, SAS Institute, Carolina del Norte). Se considerará una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

## V. Resultados

### 5.1 Peso corporal

#### 5.1.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

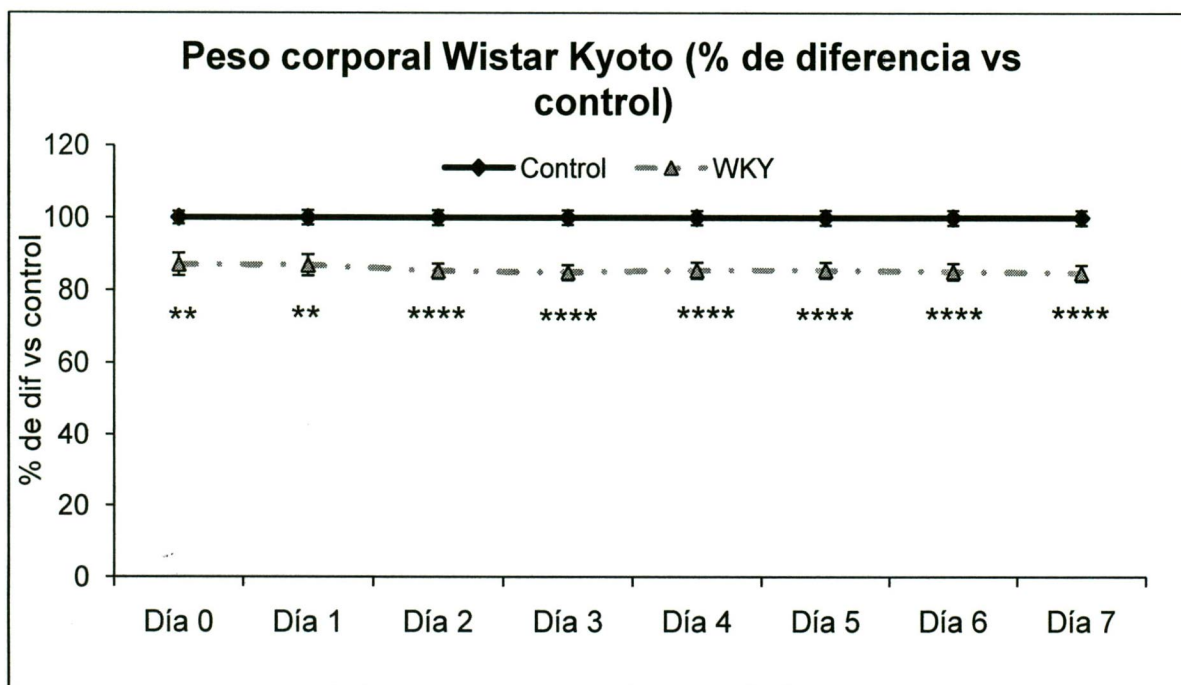
Se observó una diferencia significativa entre C y AN desde el día 2 (C:  $100 \pm 3\%$ , AN:  $87 \pm 2\%$ ;  $F_{(2,58)} = 7.448$ ,  $p < 0.01$ ). A partir del día 3 hubieron diferencias significativas entre C y AN y entre C y RA (C:  $100 \pm 2\%$ , RA:  $88 \pm 2\%$ , AN:  $81 \pm 3\%$ ;  $F_{(2,58)} = 15.829$ ,  $p < 0.0001$ ); estas diferencias se mantuvieron hasta el día 7, donde se observó la máxima disminución del peso corporal de ambos grupos experimentales (C:  $100 \pm 3\%$ , RA:  $69 \pm 2\%$ , AN:  $65 \pm 2\%$ ;  $F_{(2,58)} = 70.626$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 7). Por medio de la ANOVA de 2 vías se encontró que el peso de los animales en el día 0 fue diferente significativamente de todos los demás días, a partir del día 1 y hasta el 7 se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ese día y los siguientes a excepción del día inmediatamente posterior ( $F_{(14,464)} = 8.245$ ,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 7.** Registro diario del peso corporal de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en porcentaje de diferencia vs control. Media  $\pm$  E.E.M. Control n=20/día, RA n=20/día, AN n=21/día. ANOVA dos vías. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\* p<0.01 vs C, \*\*\* p<0.001 vs C, \*\*\*\* p<0.0001 vs C.

### 5.1.2 Paradigma Cepa Wistar Kyoto

Los animales WKY de dos meses de edad, recibieron alimento *ad libitum* al igual que los controles (CW), pero a pesar de esto en el grupo WKY se observó que el promedio del peso corporal de estos animales fue menor al de los animales CW a lo largo de los 7 días del experimento, manteniéndose la disminución a lo largo del experimento (WKY:  $85 \pm 2\%$ ;  $F_{(1,23)} = 25.338$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 8). Por medio de la ANOVA de 2 vías se observó que hubieron diferencias significativas entre grupos ( $F_{(1,184)} = 168.506$ ,  $p < 0.0001$ ), mientras que no se observaron en el tiempo ni en la interacción de grupos y tiempo ( $p > 0.05$ ).

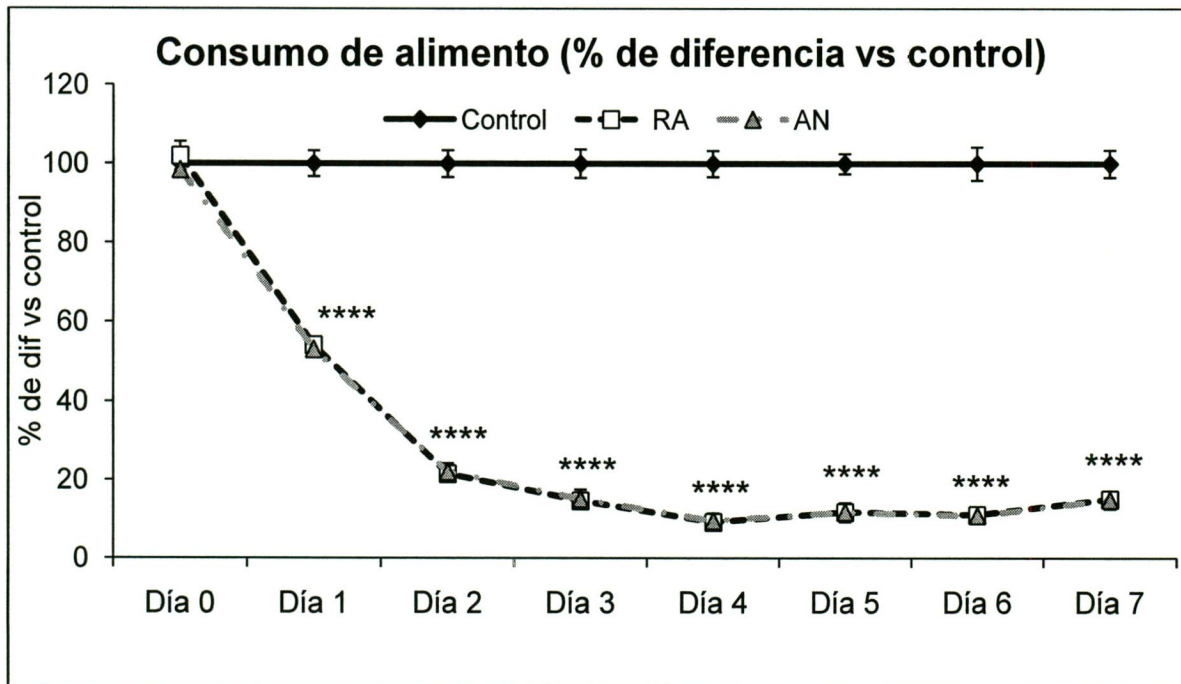


**Fig. 8.** Registro diario del peso corporal de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto). Valores expresados en porcentaje de diferencia vs control. Media  $\pm$  E.E.M. CW n= 10/día, WKY n= 10/día. ANOVA dos vías. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn. \*\*  $p < 0.01$  vs C, \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs C.

## 5.2 Consumo de alimento

### 5.2.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

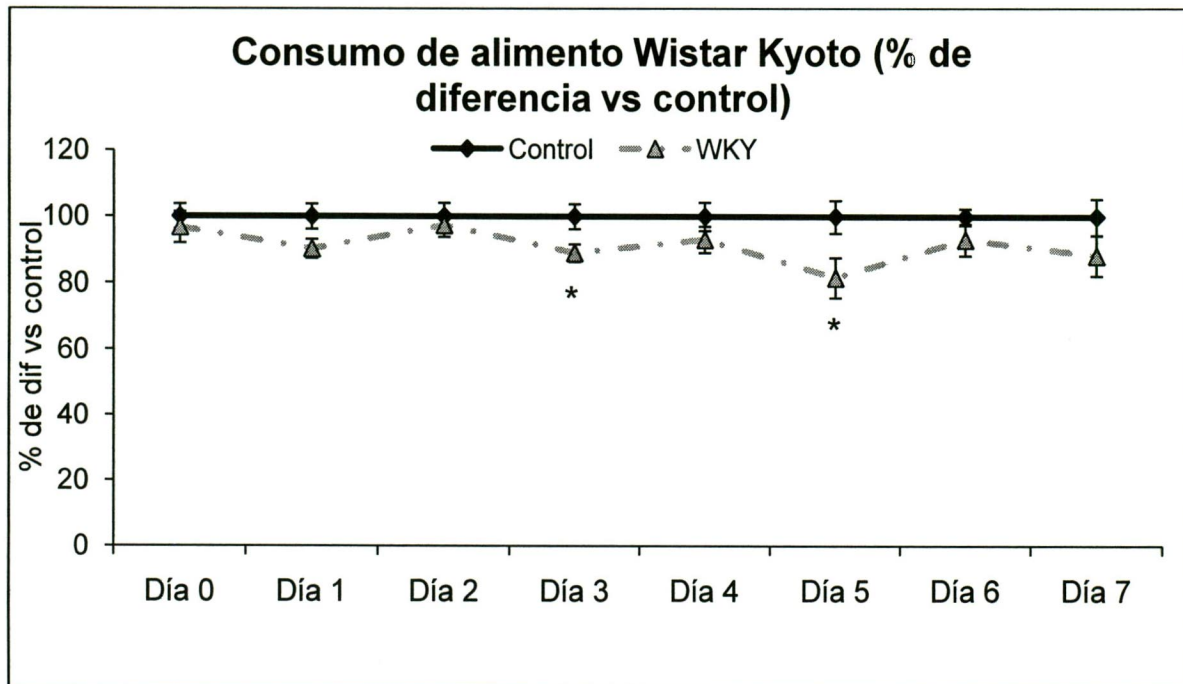
El consumo de los animales RA y AN fue el mismo por lo que la gráfica se encuentra superpuesta. Por medio de la ANOVA de 2 vías se encontró que hubieron diferencias significativas entre grupos, tiempo y en la interacción entre grupos y tiempo ( $F_{(14,464)} = 51.197$ ,  $p < 0.0001$ ). La disminución en el consumo alimentario de ambos grupos experimentales fue estadísticamente significativa a partir del día 1 y a lo largo de todo el experimento, siendo el día 4 donde se observó el consumo mínimo en RA y AN llegando a  $9.5 \pm 2\%$  del control (C:  $100 \pm 3\%$ ;  $F_{(2,58)} = 492.82$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 9).



**Fig. 9.** Registro diario del consumo de alimento de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en porcentaje de diferencia vs control. Media  $\pm$  E.E.M. Control n=20/día, RA n=20/día, AN n=21/día. ANOVA dos vías. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\*\*\* p<0.0001 vs C.

### 5.2.2 Paradigma Cepa Wistar Kyoto

Por medio de la ANOVA de 2 vías se observó que hubieron diferencias significativas entre grupos ( $F_{(1,144)} = 16.577$ ,  $p < 0.0001$ ), mientras que no se observaron con respecto al tiempo ni en la interacción de grupos y tiempo ( $p > 0.05$ ). El consumo de alimento de los animales WKY únicamente fue significativamente menor en los días 3 y 5 del experimento en comparación a CW. (Día 3: CW:  $100 \pm 4\%$ , WKY:  $89 \pm 3\%$ ;  $F_{(1,18)} = 5.644$ ,  $p < 0.05$ ; Día 5: CW:  $100 \pm 5\%$ , WKY:  $82 \pm 6\%$ ;  $F_{(1,18)} = 5.551$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 10).



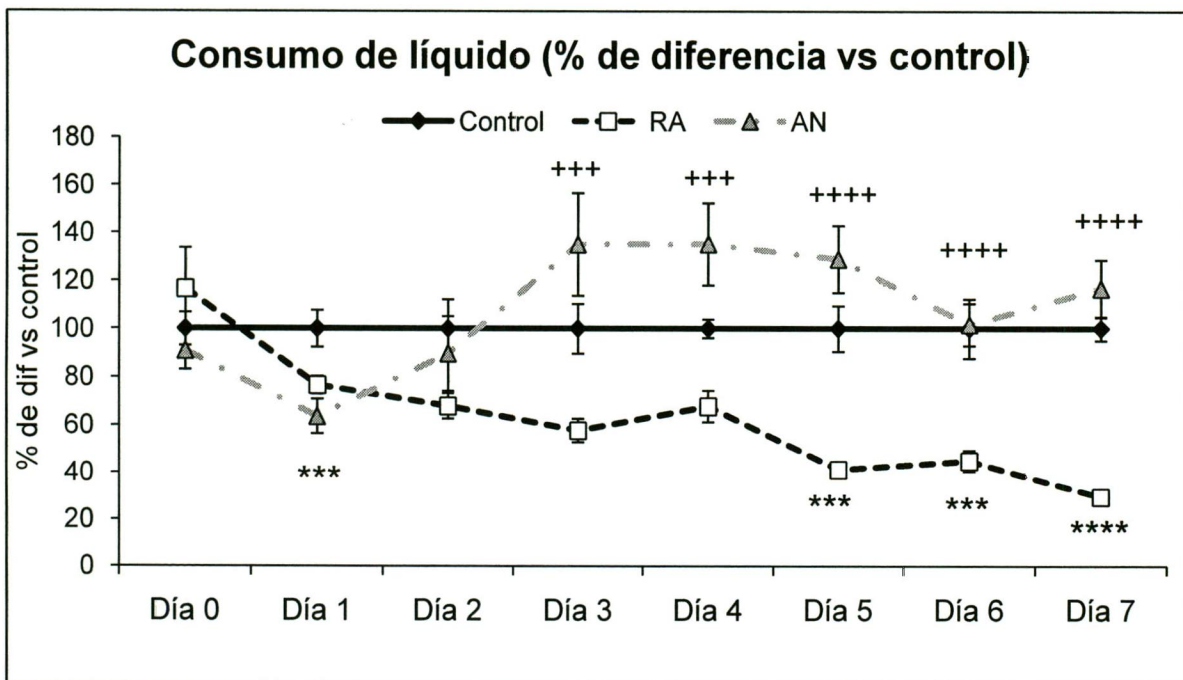
**Fig. 10.** Registro diario del consumo de alimento de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto). Valores expresados en porcentaje de diferencia vs control. Media  $\pm$  E.E.M. CW n= 10/día, WKY n= 10/día. ANOVA dos vías. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn. \*  $p < 0.05$  vs C.

## 5.3 Consumo de líquido

### 5.3.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

A los animales C y RA se les ofreció agua, mientras que a los AN se les ofreció solución salina al 2.5%. Tanto en los animales RA como AN se observó una disminución del consumo de líquido en el día 1, aunque únicamente la disminución del grupo AN es estadísticamente significativa en comparación al C (C:  $100 \pm 7\%$ , RA:  $77 \pm 4\%$ , AN:  $\pm 7\%$ ;  $F_{(2,56)} = 7.22$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 11).

A partir del día 3 y hasta el 7 se observó un aumento estadísticamente significativo del consumo de líquido de los animales AN en comparación con los animales RA ( $F_{(2,58)}=30.569$ ,  $p<0.001$ ), los cuales consumieron menos cantidad de líquido que los animales control a partir del día 5 y hasta el 7 ( $F_{(2,58)}=30.569$ ,  $p<0.001$ ). Por medio de la ANOVA de 2 vías se observó que hubieron diferencias significativas entre grupos ( $F_{(2,456)}=36.73$ ,  $p<0.0001$ ) y en la interacción entre grupos y tiempo ( $F_{(14,456)}=4.523$ ,  $p<0.0001$ ), mientras que no se observaron con respecto al tiempo ( $p>0.05$ ).

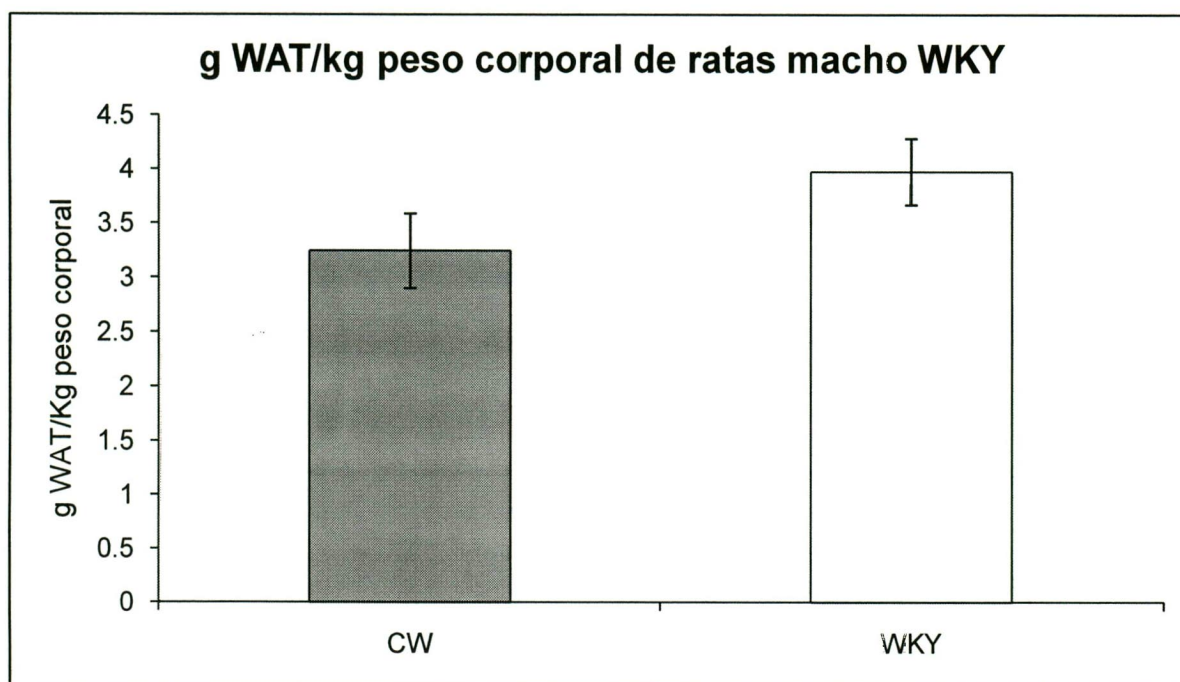


**Fig. 11.** Registro diario del consumo de líquido de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en porcentaje de diferencia vs control. Media  $\pm$  E.E.M. Control  $n=20/\text{día}$ , RA  $n=20/\text{día}$ , AN  $n=21/\text{día}$ . ANOVA dos vías. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\*\*  $p<0.001$  vs C, \*\*\*\*  $p<0.0001$  vs C, +++  $p<0.001$  vs RA, \*\*\*\*  $p<0.0001$  vs RA.

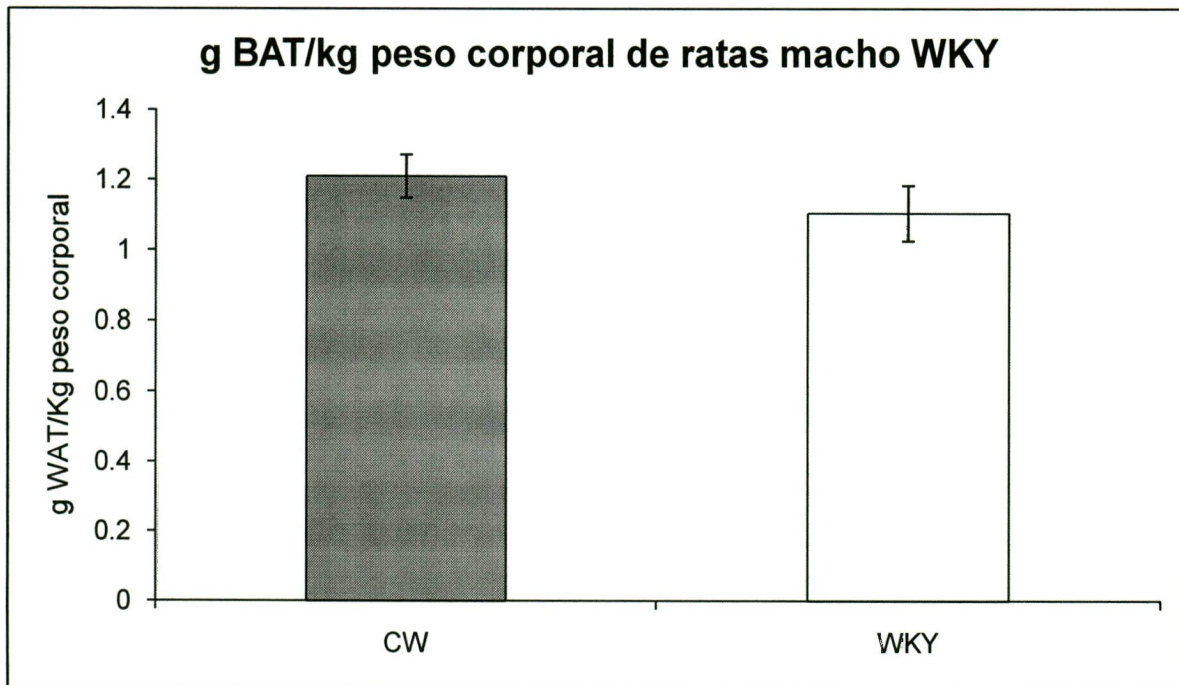
## 5.4 Peso masa grasa corporal/Kg peso corporal

### 5.4.1 Paradigma Cepa Wistar Kyoto

El peso de la masa grasa, tanto abdominal (tejido adiposo blanco, WAT), como subescapular (tejido adiposo pardo, BAT), es similar en animales CW y WKY, por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) (Fig. 12 y 13).



**Fig. 12.** Registro del peso del tejido adiposo abdominal (blanco, WAT) de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto) al día 7 del experimento. Valores expresados en g WAT/Kg peso corporal. Media  $\pm$  E.E.M. CW n= 10/día, WKY n= 10/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn.



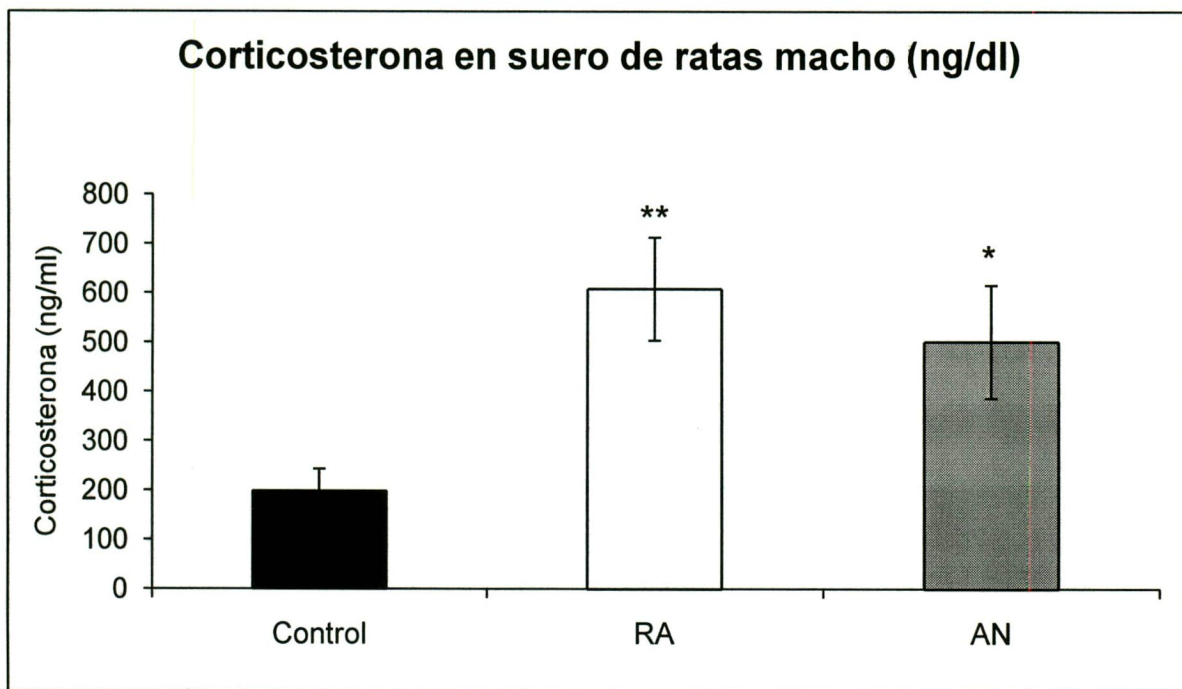
**Fig. 13.** Registro del peso del tejido adiposo subescapular (pardo, BAT) de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto) al día 7 del experimento. Valores expresados en g WAT/Kg peso corporal. Media  $\pm$  E.E.M. CW n= 10/día, WKY n= 10/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn.

La masa grasa de los animales sometidos a anorexia por deshidratación se han publicado anteriormente (67).

## 5.5 Corticosterona sérica

### 5.5.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

El contenido de corticosterona en suero en animales macho tanto RA como AN mostró un aumento significativo contra C al finalizar el experimento (C:  $100 \pm 22\%$ ,  $1989 \pm 44$  ng/dl; RA:  $306 \pm 53\%$ ,  $608 \pm 105$  ng/dl AN:  $252 \pm 58\%$ ,  $501 \pm 115$  ng/dl;  $F_{(2,22)} = 4.927$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 14).

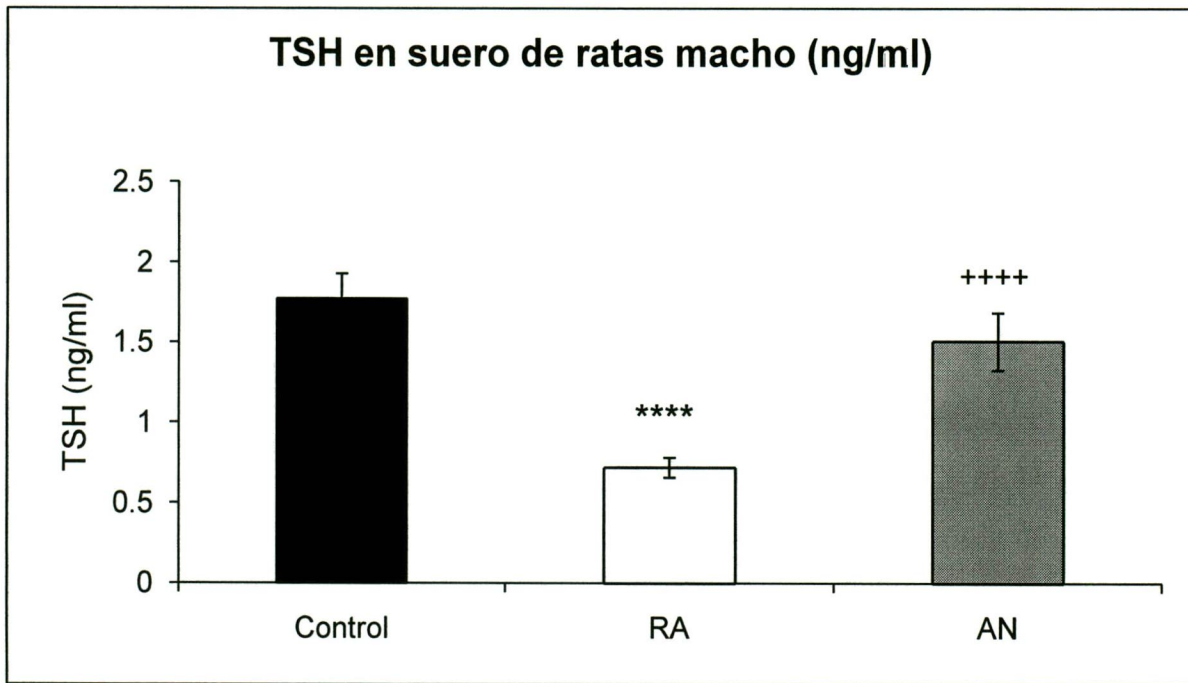


**Fig 14.** Concentración sérica de corticoesterona de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en ng/dl. Media  $\pm$  E.E.M. Control n=8/día, RA n=8/día, AN n=8/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Fisher, \* $p < 0.05$  vs C, \*\*  $p < 0.001$  vs C.

## 5.6 Tirotrópina (TSH) sérica

### 5.6.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

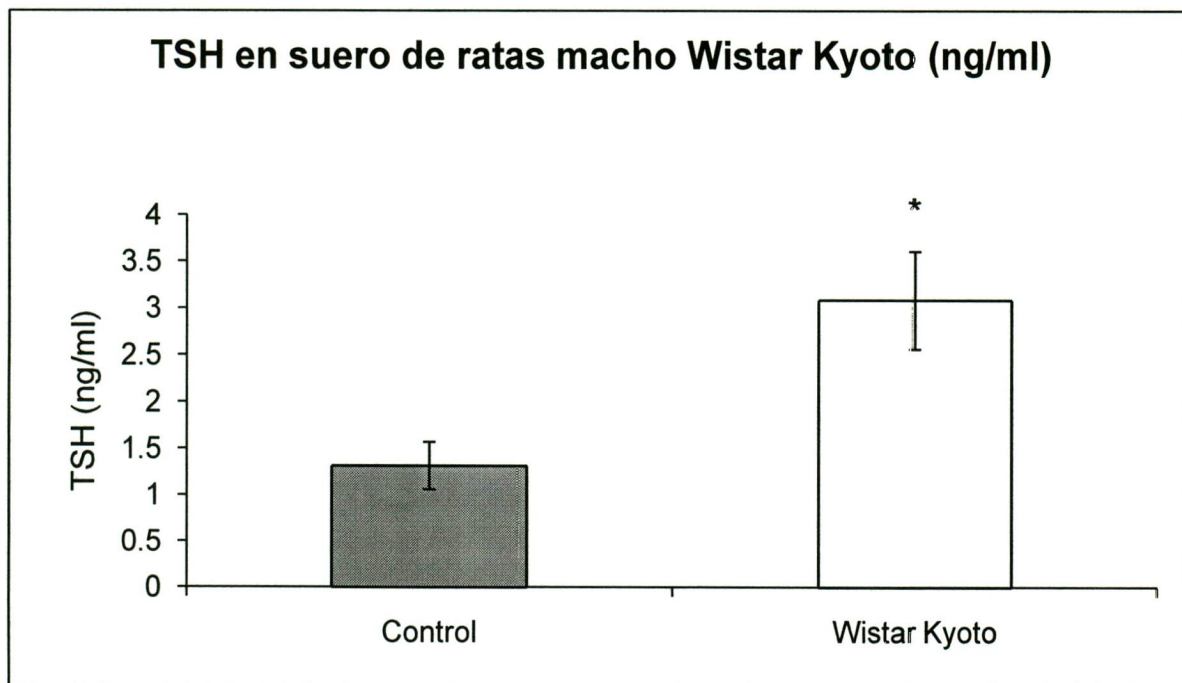
La concentración de TSH en suero de animales machos RA disminuyó en comparación al control y a los animales AN, la cual llegó a  $41 \pm 3\%$  (C:  $100 \pm 9\%$ ,  $1.8 \pm 0.2$  ng/ml; AN:  $85 \pm 10\%$ ,  $1.5 \pm 0.2$  ng/ml;  $F_{(2,99)} = 18.218$ ,  $p < 0.001$ ). (Fig. 15).



**Fig 15.** Concentración sérica de TSH de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en ng/ml. Media  $\pm$  E.E.M. Control n=8/día, RA n=8/día, AN n=8/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\*\*\* p<0.0001 vs C, +++++ p<0.0001 vs RA.

### 5.6.2 Paradigma Wistar Kyoto

Las concentración de TSH en suero de animales machos WKY fue significativamente mayor vs CW al finalizar el experimento, llegando a  $235 \pm 40\%$  (CW:  $100 \pm 19\%$ ,  $1.3 \pm 0.2$  ng/ml; WKY:  $235 \pm 40\%$ ,  $3.1 \pm 0.5$  ng/ml;  $F_{(1,15)} = 8.523$ , p<0.05) (Fig. 16).

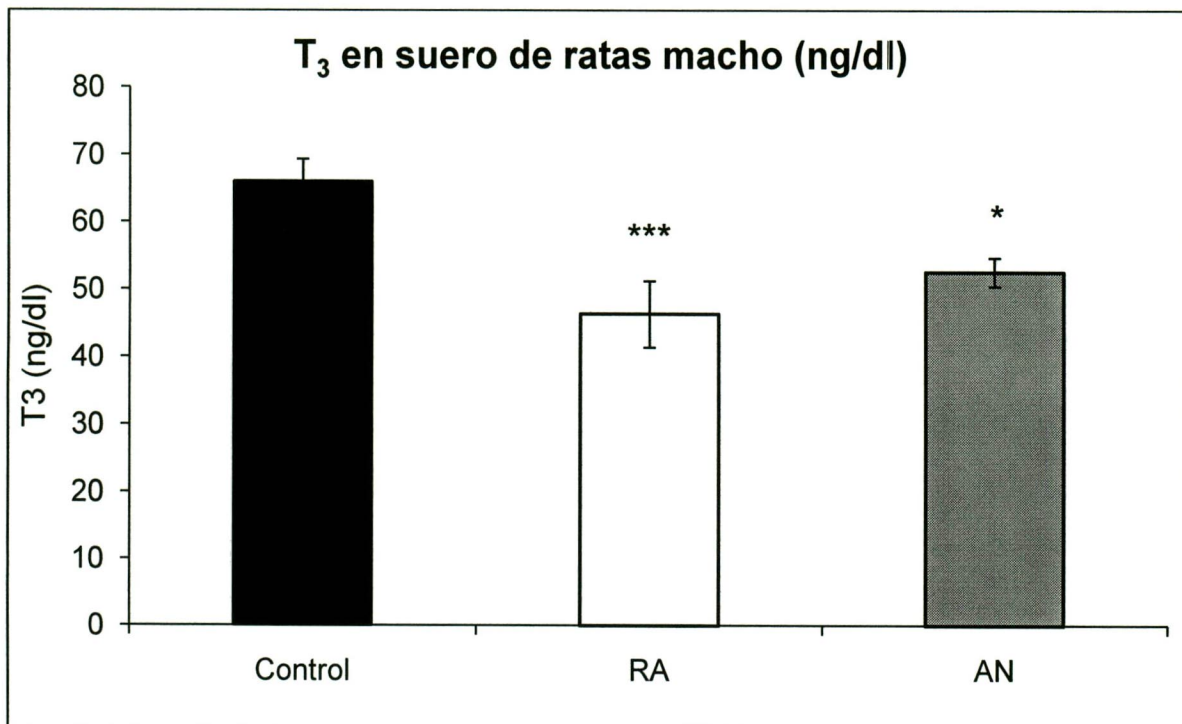


**Fig. 16.** Concentración sérica de TSH de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto). Valores expresados en ng/ml. Media  $\pm$  E.E.M. CW n= 10/día, WKY n= 10/día. ANOVA una vías. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \* p<0.05 vs CW.

## 5.7 Triyodotironina (T<sub>3</sub>) sérica

### 5.7.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

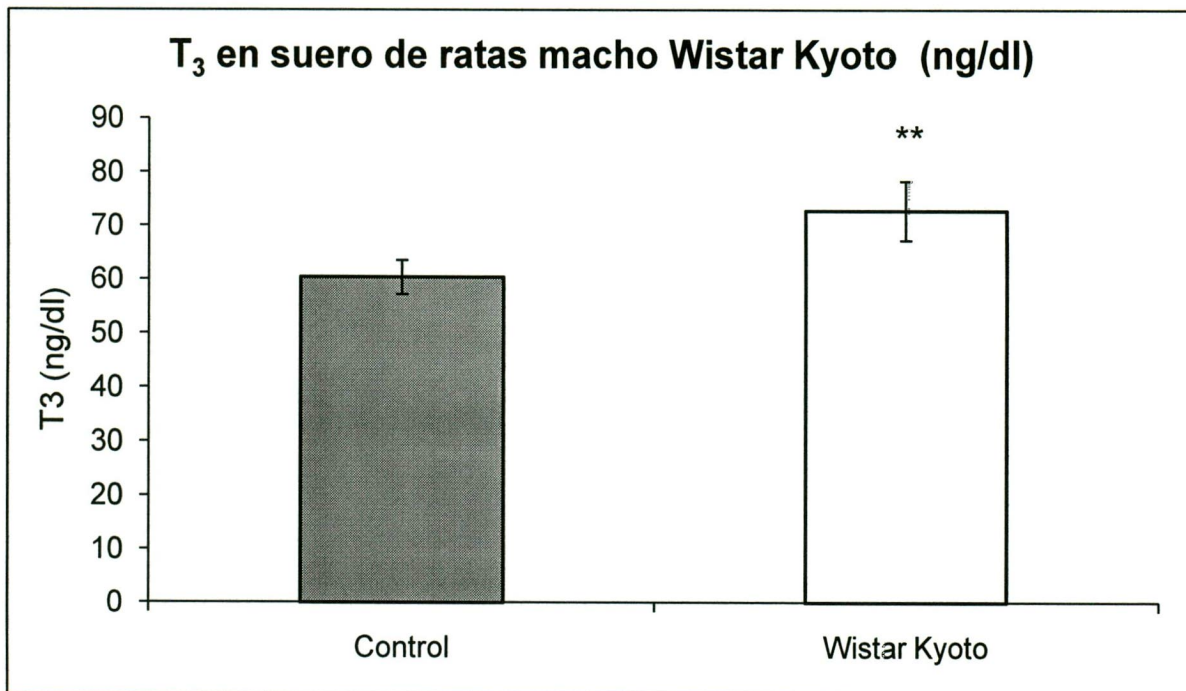
La concentración de T<sub>3</sub> en suero de animales machos RA y AN mostró una disminución estadísticamente significativa vs control ( $F_{(2,21)} = 7.751$ ,  $p < 0.01$ ), llegando a  $70 \pm 7\%$  y  $80 \pm 3\%$  respectivamente (C:  $100 \pm 5\%$ ,  $66 \pm 3$  ng/dl) (Fig. 17).



**Fig 17.** Concentración sérica de T<sub>3</sub> de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en ng/dl. Media ± E.E.M. Control n=8/día, RA n=8/día, AN n=8/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \* p<0.05 vs C, \*\*\* p<0.001 vs C.

### 5.7.2 Paradigma Wistar Kyoto

Las concentración de T<sub>3</sub> en suero de animales machos WKY fue significativamente mayor vs CW al finalizar el experimento, llegando a 132 ± 7% (CW: 100 ± 5%, 58.5 ± 3 ng/dl; WKY: 132 ± 7%, 77 ± 4 ng/dl; F<sub>(1,16)</sub>= 13.555, p<0.01) (Fig. 18).

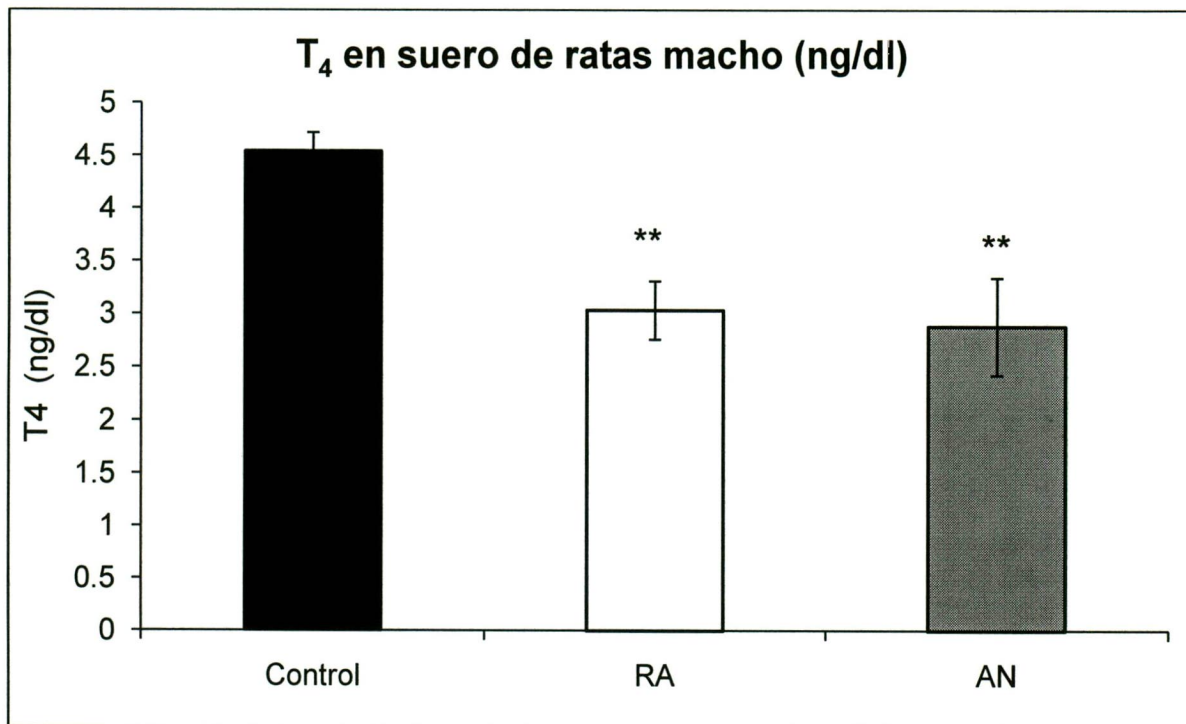


**Fig. 18.** Concentración sérica de T<sub>3</sub> de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto). Valores expresados en ng/dl. Media ± E.E.M. CW n= 10/día, WKY n= 10/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn. \*\* p<0.01 vs CW.

## 5.8 Tiroxina (T<sub>4</sub>) sérica

### 5.8.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

La concentración de T<sub>4</sub> en suero de animales machos RA y AN mostró una disminución estadísticamente significativa vs control ( $F_{(2,21)} = 8.006$ ,  $p < 0.01$ ), llegando a  $67 \pm 6\%$  y  $63 \pm 10\%$  respectivamente (C:  $100 \pm 4\%$ ,  $4.5 \pm 0.2$  ng/dl) (Fig. 19).

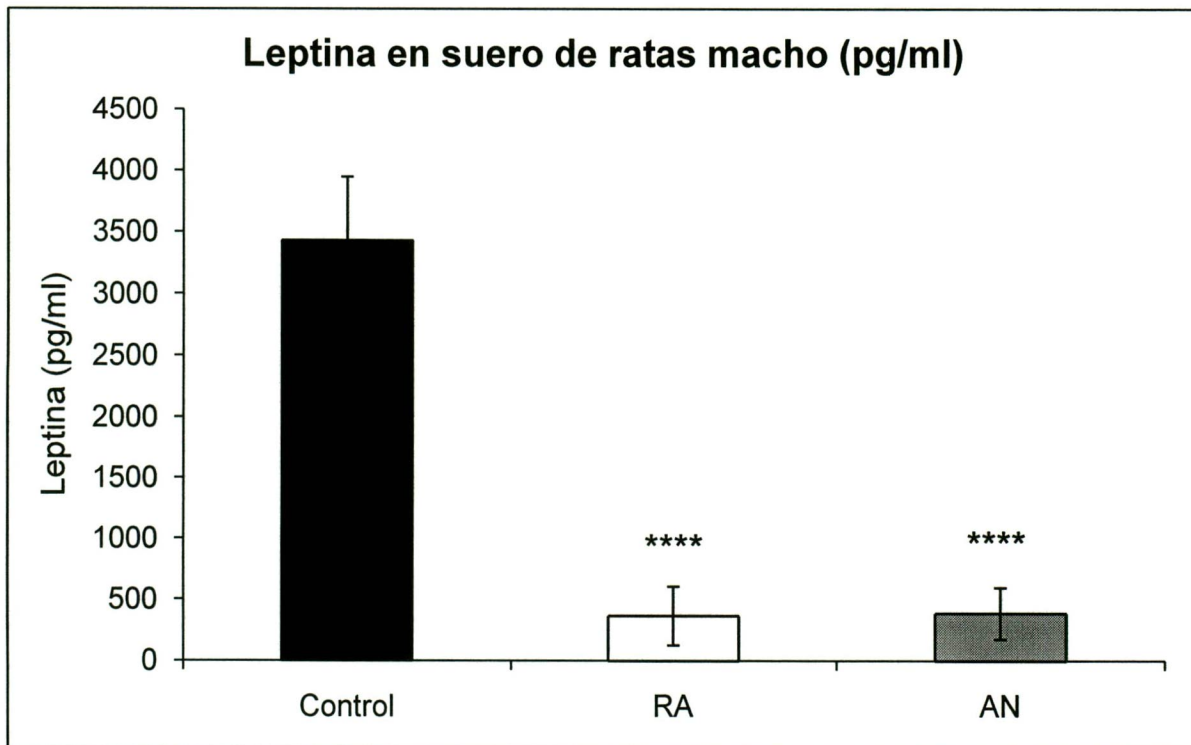


**Fig 19.** Concentración sérica de T<sub>4</sub> de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en ng/dl. Media ± E.E.M. Control n=8/día, RA n=8/día, AN n=8/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\* p<0.01 vs C.

## 5.9 Leptina sérica

### 5.9.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

La concentración de leptina en suero de animales macho RA y AN mostró una disminución estadísticamente significativa vs control ( $F_{(2,21)} = 25.356$ ,  $p < 0.0001$ ), llegando a  $11 \pm 7\%$  y  $15 \pm 8\%$  respectivamente (C:  $100 \pm 15\%$ ,  $3430 \pm 516$  pg/ml) (Fig. 20).



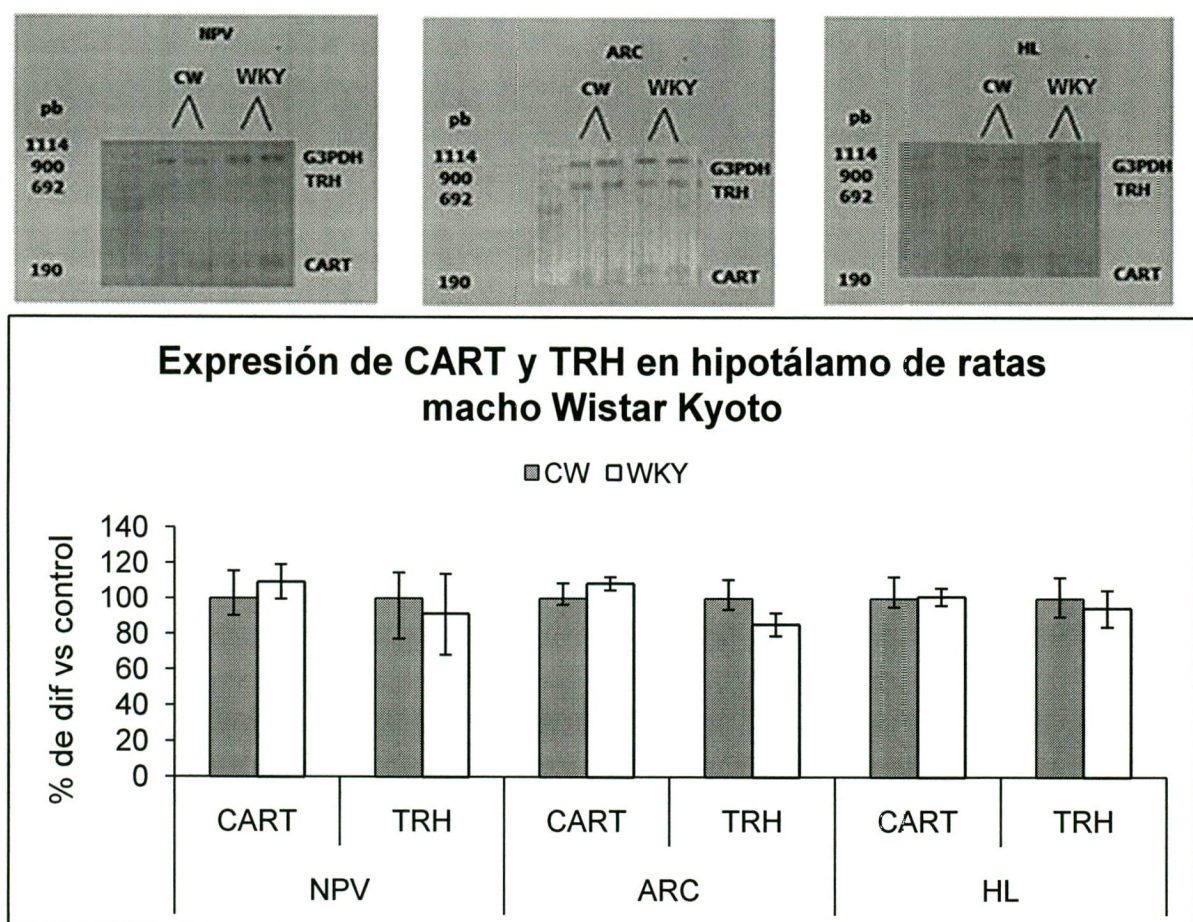
**Fig 20.** Concentración sérica de leptina de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación). Valores expresados en pg/ml. Media  $\pm$  E.E.M. Control n=8/día, RA n=8/día, AN n=8/día. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\*\*\* p<0.0001 vs C.

### 5.9.2 Paradigma Wistar Kyoto

La concentración de leptina en suero de animales machos WKY no se pudo detectar debido a que fue muy baja (CW= 2277  $\pm$  415 pg/ml).

## 5.10 Expresión del RNAm de *CART* por RT-PCR en el paradigma de la cepa Wistar Kyoto

La expresión del RNAm de *CART* en NPV, ARC e HL de los animales WKY no tuvo cambios significativos vs CW al término del experimento ( $p > 0.05$ ) (Fig. 21). La expresión del RNAm de *CART* por RT-PCR ya se ha realizado anteriormente en el paradigma de anorexia por deshidratación (109).



**Fig 21.** Contenido de RNAm de *CART* en NPV, ARC e HL de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto). Valores expresados en porcentaje de diferencia vs control. Media  $\pm$  E.E.M. Control  $n=6/\text{día}$ , WKY  $n=6/\text{día}$ . ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn,  $p > 0.05$ .

## 5.11 Expresión del RNAm de *CART* por ISH

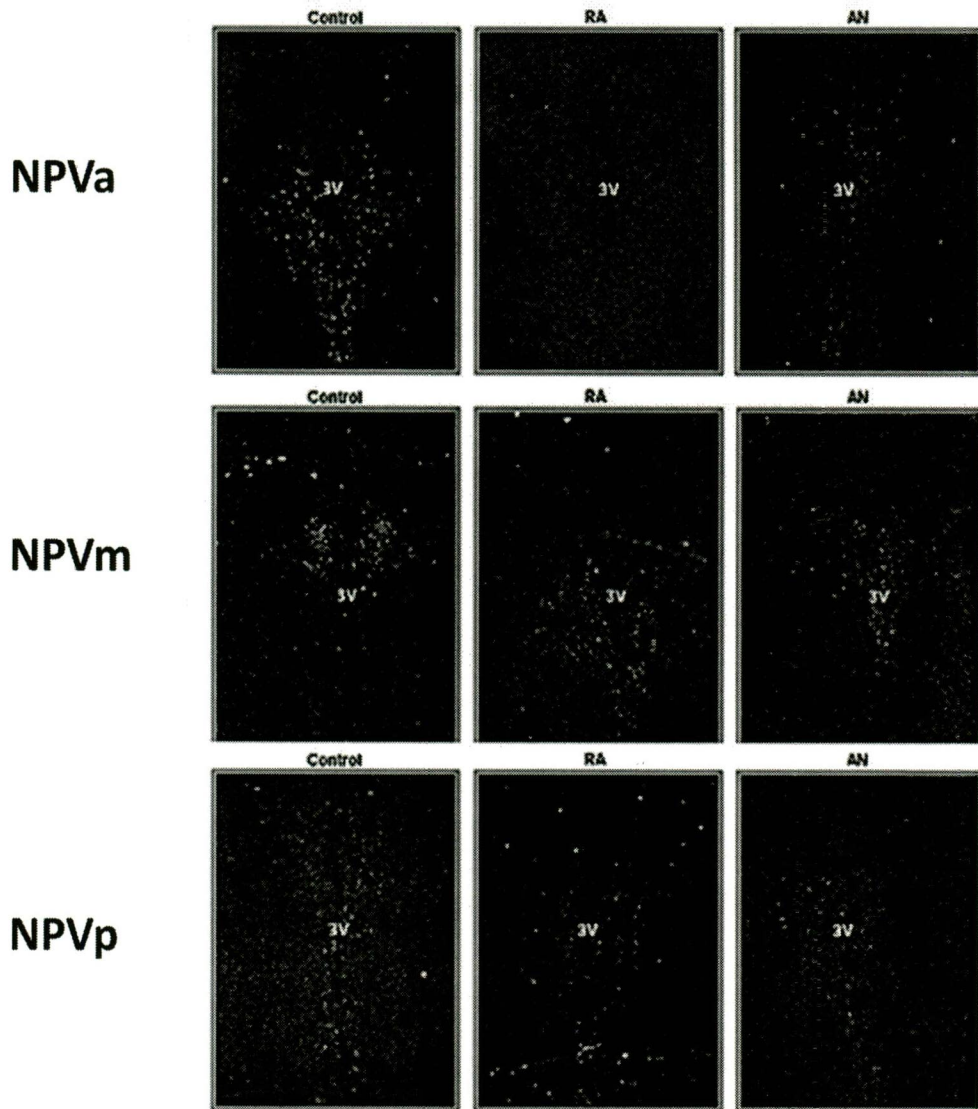
### 5.11.1 *Paradigma Anorexia por deshidratación*

#### 5.11.1.1 NPV anterior, medial y posterior

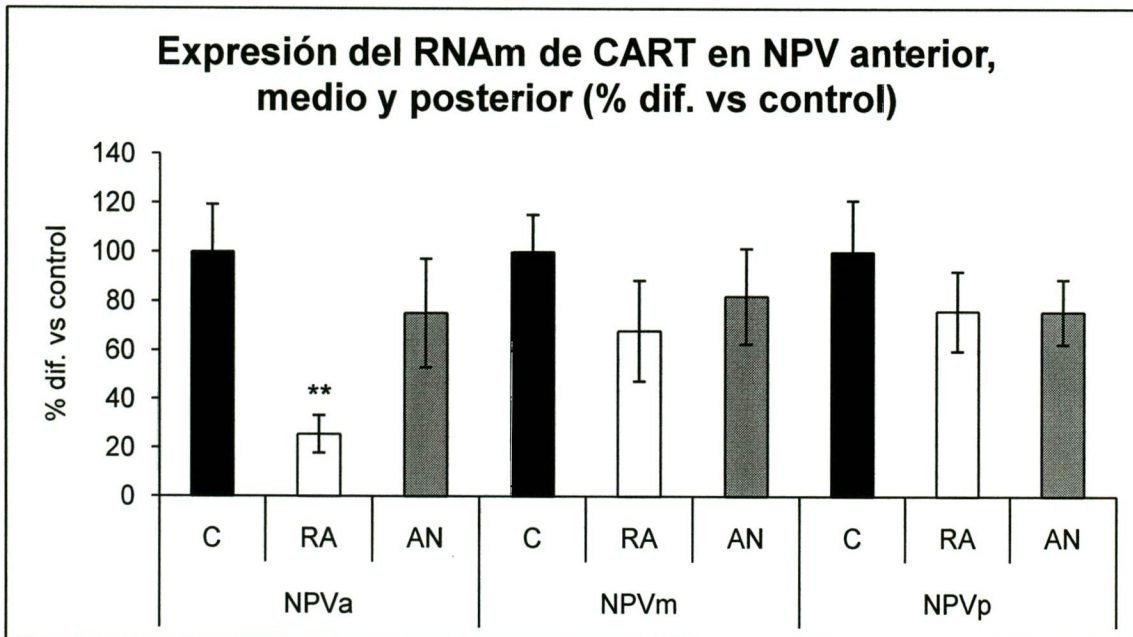
La señal de hibridación del RNAm de *CART* en el NPV anterior de animales RA fue significativamente menor vs C ( $F_{(2,17)} = 5.224$ ,  $p < 0.05$ ). (Fig. 22 y 23). No hubo diferencias significativas de animales AN vs C o RA ( $p > 0.05$ ).

La señal de hibridación del RNAm de *CART* en el NPV medial de animales RA y AN no mostró diferencias significativas vs C ( $p > 0.05$ ) (Fig. 22 y 23).

La señal de hibridación del RNAm de *CART* en el NPV posterior de animales RA y AN no mostró diferencias significativas vs C ( $p > 0.05$ ). (Fig. 22 y 23).



**Fig. 22.** Fotomicrografía en campo oscuro mostrando la expresión del RNAm de CART en el NPV anterior, medio y posterior de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. 3V, tercer ventrículo.

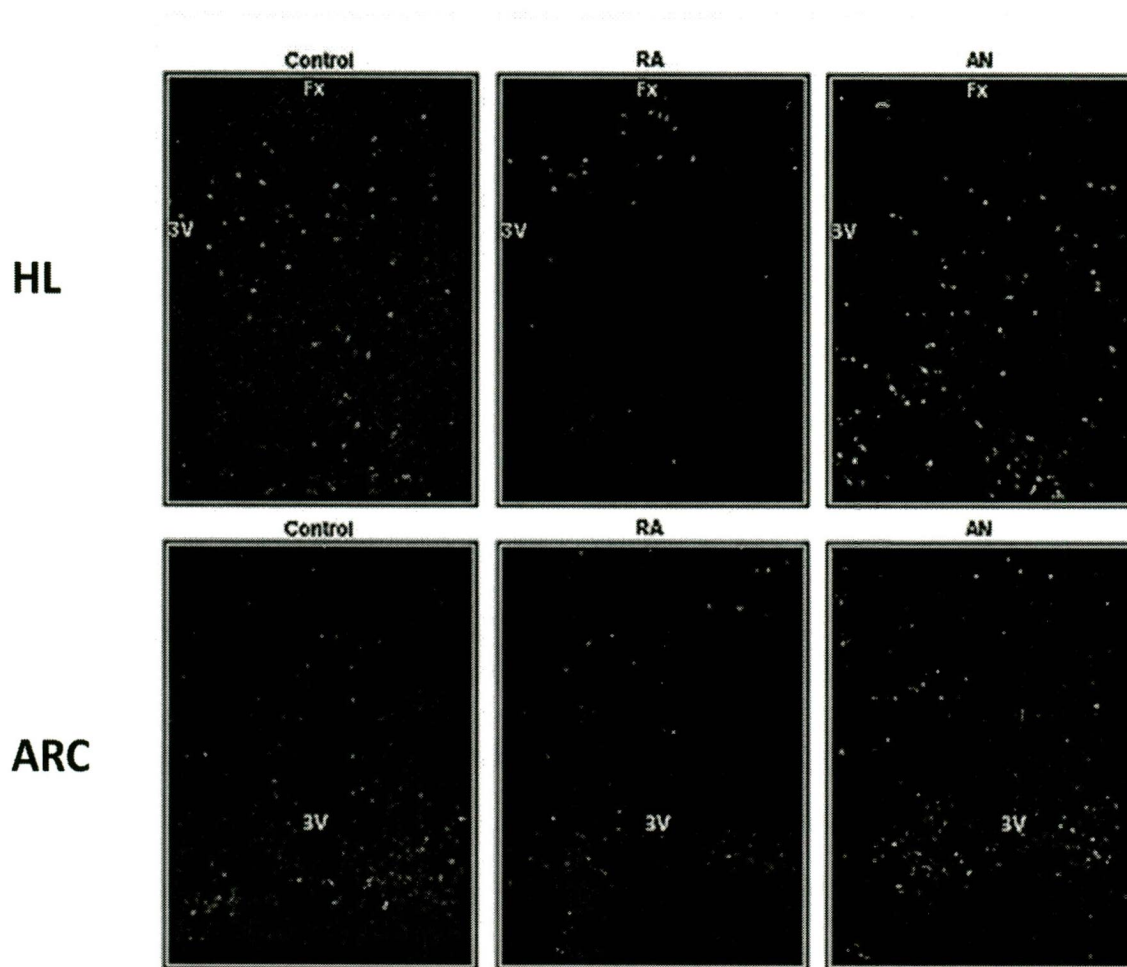


**Fig. 23.** Análisis computarizado de la imagen de la expresión del RNAm de CART en el NPV anterior de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. Valores expresados en porcentaje de diferencia vs C (C= 100%). Media  $\pm$  E.E.M. n=8/grupo. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\*  $p < 0.01$  vs C.

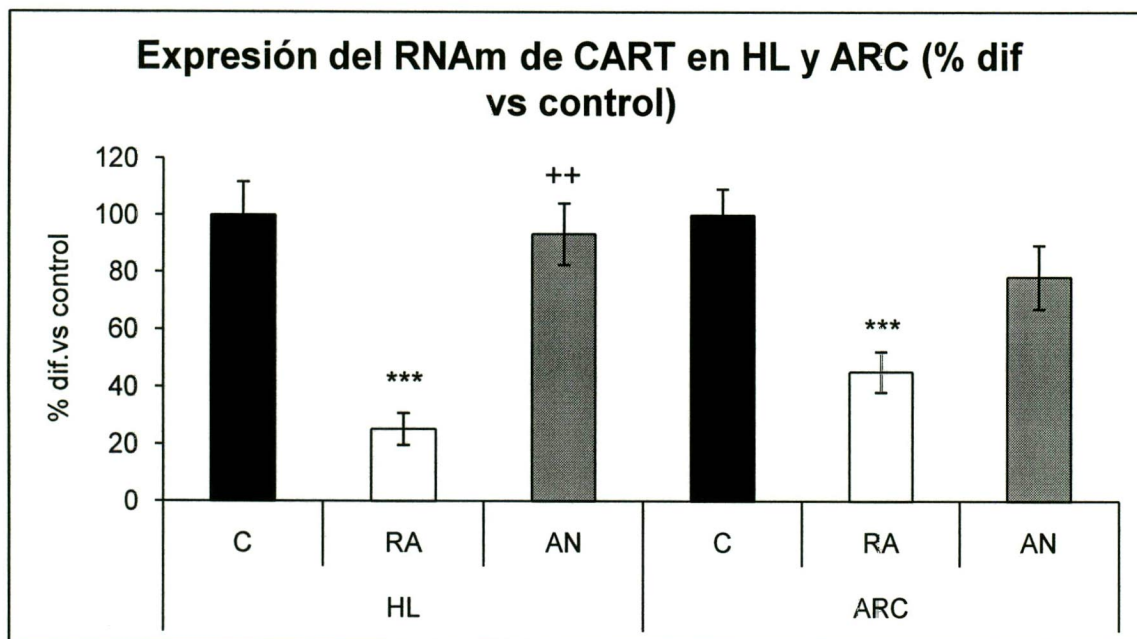
### 5.11.1.2 Hipotálamo Lateral y ARC

La señal de hibridación del RNAm de CART en el HL de animales RA fue menor significativamente vs C y AN ( $F_{(2,15)} = 11.001$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 28 y 29).

La señal de hibridación del RNAm de CART en el ARC de animales RA fue menor significativamente vs C ( $F_{(2,19)} = 10.287$ ,  $p < 0.001$ ). (Fig. 24 y 25).



**Fig. 24.** Fotomicrografía en campo oscuro mostrando la expresión del RNAm de CART en el HL y ARC de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. 3V, tercer ventrículo; Fx, fórnix.



**Fig. 25.** Análisis computarizado de la imagen de la expresión del RNAm de CART en el HL y ARC de ratas macho C (control), RA (restricción alimentaria) y AN (anorexia por deshidratación), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. Valores expresados en porcentaje de diferencia vs C (C= 100%). Media  $\pm$  E.E.M. n=8/grupo. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*\*\*  $p < 0.001$  vs C, ++  $p < 0.01$  vs RA.

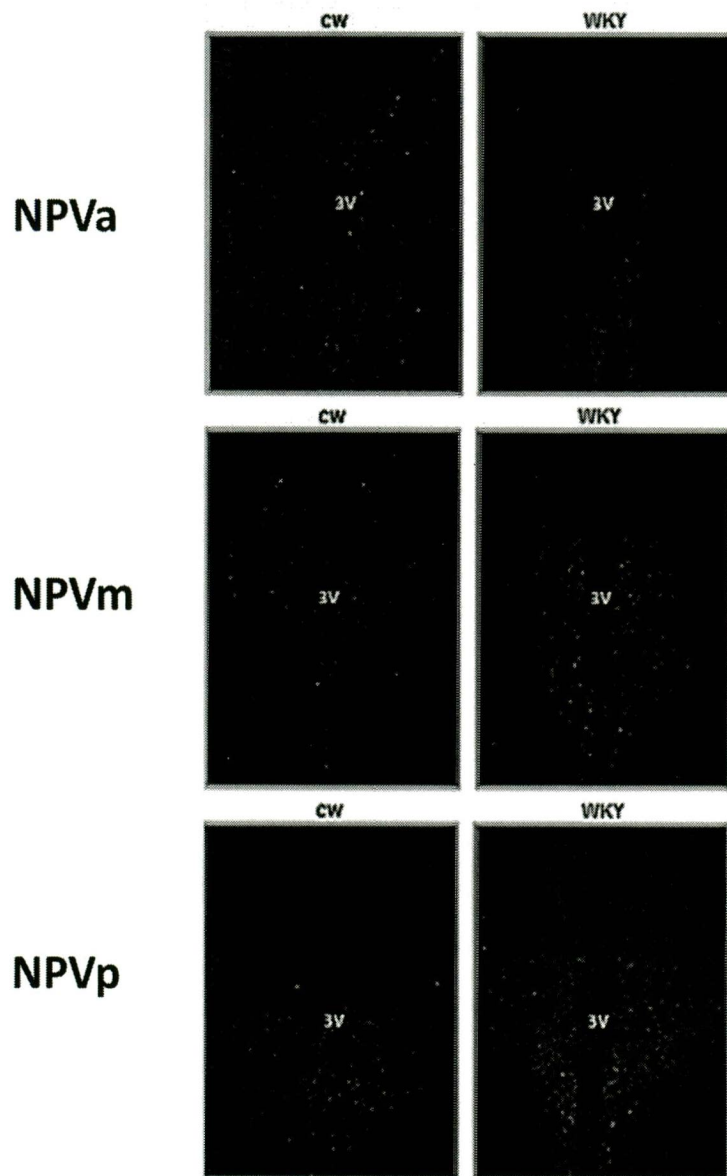
## 5.11.2 Paradigma Wistar Kyoto

### 5.11.2.1 NPV anterior, medial y posterior

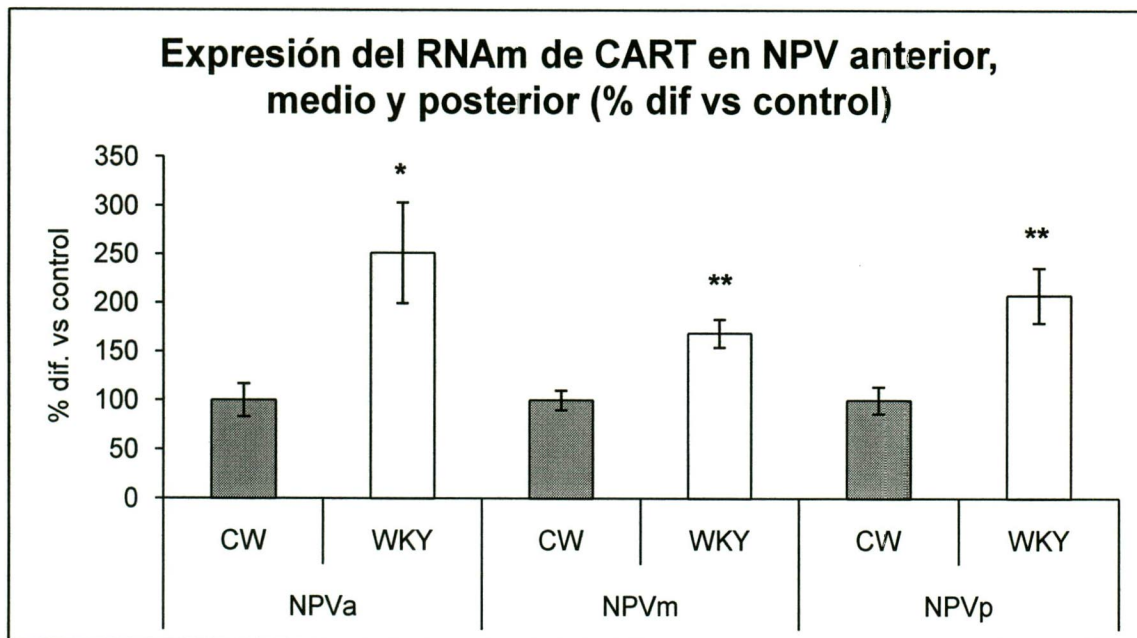
La señal de hibridación del RNAm de CART en el NPV anterior de animales WKY fue mayor significativamente vs CW ( $F_{(1,10)} = 7.692$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 26 y 27).

La señal de hibridación del RNAm de CART en el NPV anterior de animales WKY fue mayor significativamente vs CW ( $F_{(1,14)} = 15.574$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 26 y 27).

La señal de hibridación del RNAm de CART en el NPV anterior de animales WKY mostró aumento significativo vs CW ( $F_{(1,14)} = 11.717$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 26 y 27).



**Fig. 26.** Fotomicrografía en campo oscuro mostrando la expresión del RNAm de CART en el NPV anterior, medio y posterior de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. 3V, tercer ventrículo.



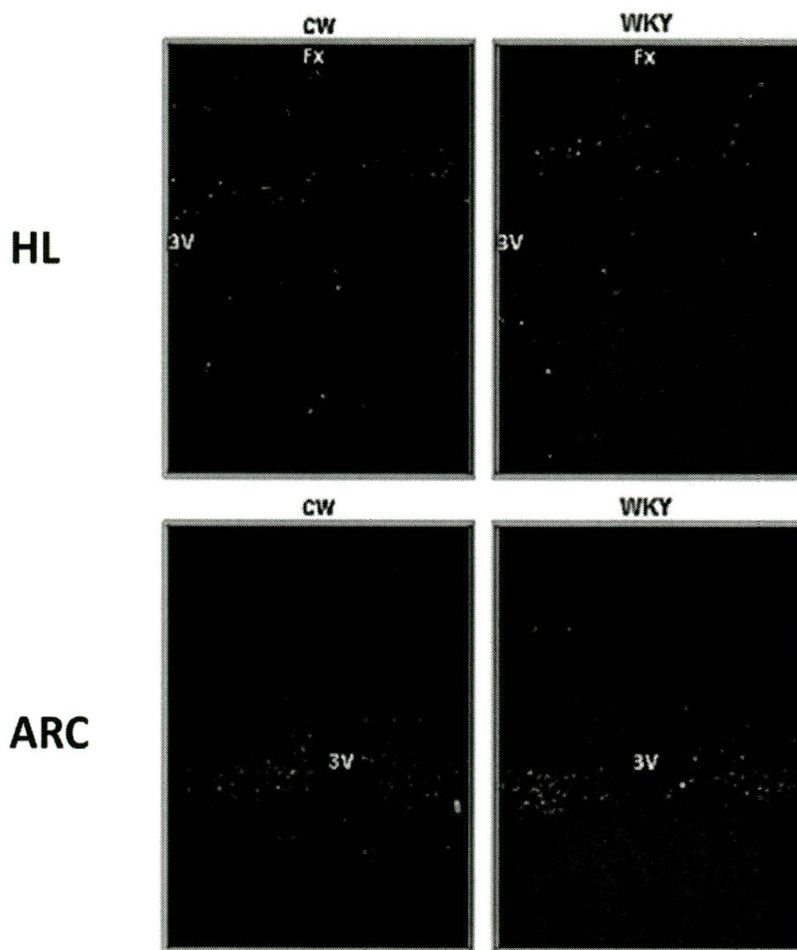
**Fig. 27.** Análisis computarizado de la imagen de la expresión del RNAm de CART en el NPV anterior, medio y posterior de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con <sup>35</sup>S-CART. Valores expresados en porcentaje de diferencia vs CW (CW= 100%). Media ± E.E.M. n=8/grupo. ANOVA una vía.

Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn, \*p<0.05 vs CW, \*\*p<0.01 vs CW.

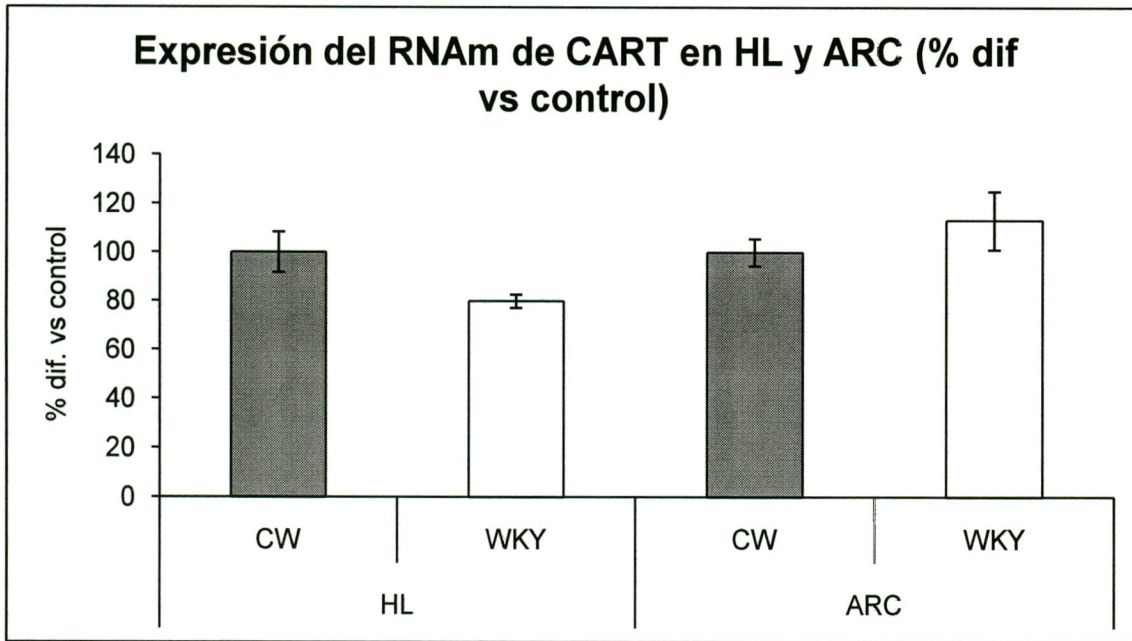
### 5.11.2.2 Hipotálamo Lateral y ARC

La señal de hibridación del RNAm de CART en el HL de animales WKY no mostró diferencias significativas entre CW y WKY ( $p > 0.05$ ) (Fig. 28 y 29).

La señal de hibridación del RNAm de CART en el ARC de animales WKY no mostró diferencias significativas vs CW ( $p > 0.05$ ) (Fig. 28 y 29).



**Fig. 28.** Fotomicrografía en campo oscuro mostrando la expresión del RNAm de CART en el HL y ARC de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. 3V, tercer ventrículo; Fx, fórnix.



**Fig. 29.** Análisis computarizado de la imagen de la expresión del RNAm de CART en el HL y ARC de ratas macho CW (control Wistar) y WKY (Wistar Kyoto), detectada por ISH utilizando sondas de oligonucleótidos marcadas con  $^{35}\text{S}$ -CART. Valores expresados en porcentaje de diferencia vs CW (CW= 100%). Media  $\pm$  E.E.M. n=8/grupo. ANOVA una vía. Prueba post-hoc de Bonferroni/Dunn.

## 5.12 Resumen de resultados integrados

Los resultados se resumen en la tabla 4, donde los cambios significativos que se muestran, ya sea aumento o disminución, son contra su respectivo control (C en anorexia por deshidratación; CW en cepa Wistar Kyoto), a menos que se indique lo contrario.

**Tabla 4.** Resumen de resultados integrados.

	Anorexia por deshidratación		Cepa Wistar Kyoto
	RA	AN	WKY
<b>Peso corporal</b>	↓	↓	↓
<b>Consumo de alimento</b>	↓	↓	↓/=
<b>Tejido adiposo blanco</b>	↓ (67)	↓ (67)	=
<b>Tejido adiposo pardo</b>	↓ (67)	↓ (67)	=
<b>Corticosterona sérica</b>	↑	↑	↑ (114)
<b>TSH sérica</b>	↓	↑ vs RA	↑
<b>T<sub>3</sub> sérica</b>	↓	↓	↑
<b>T<sub>4</sub> sérica</b>	↓	↓	= (113)
<b>Leptina sérica</b>	↓	↓	↓
	RNAm de CART		
<b>NPVa</b>	↓	=	↑
<b>NPVm</b>	=	=	↑
<b>NPVp</b>	=	=	↑
<b>HL</b>	↓	↑ vs RA	=
<b>ARC</b>	↓	=	=

## VI. Discusión

### 6.1 *Peso corporal y consumo de alimento*

#### 6.1.1 *Paradigma Anorexia por deshidratación*

Los animales que presentan un balance energético negativo, como los que se encuentran bajo restricción alimentaria, tanto forzada (RA) como voluntaria (AN), presentan cambios en el contenido sérico de hormonas y en la expresión de neuropéptidos hipotalámicos involucrados en la regulación de la homeostasis energética. Todos estos cambios favorecen la adaptación del organismo a la menor disponibilidad de alimentos (121).

Al evaluarse la expresión de NPY y de POMC (que son los péptidos orexigénicos y anorexigénicos más potentes en el ARC) de animales RA y AN, se observa que no existe diferencia, lo que descarta su participación en la aparición de la conducta de anorexia en animales AN. Lo mismo sucede con la *neurotensina (NT/N)* en ARC. Puesto que la concentración sérica de corticosterona, leptina e insulina (99) es también similar entre animales que están motivados por la búsqueda de alimentos y los que no lo están, tampoco pueden ser responsables de la anorexia de los animales AN.

En cambio, al analizar la expresión de *pro-TRH* (considerado un péptido con acción anorexigénica) en el NPV, se ha visto que solo el grupo de AN presenta un aumento en el contenido de RNAm de *TRH*, específicamente en las regiones anterior y posterior del NPV (67, 73, 100, 103). Los cambios en la expresión de *TRH* en los animales AN están acompañados de incremento en la concentración sérica de TSH y de reducción del

contenido del RNAm del *receptor de TRH (TRH-R1)* en la adenohipófisis (67), lo que implica que el eje tiroideo no se adapta en AN al déficit de nutrientes como lo hace el de RA. Estos cambios se revierten por la inyección del antagonista específico al receptor CRH-R2 (ASG-30) restableciéndose la habilidad de adaptación del eje HHT al estímulo de AN (73); pero al analizar la conducta alimentaria (registro del consumo alimentario) en animales inyectados con este fármaco, sólo se observa una atenuación de la anorexia, y no una reversión total. Por esto se ha sugerido que hay otros factores involucrados en la desmotivación por el consumo de alimentos en los animales deshidratados, tales como la desregulación en la vía de señalización de NPY mediada por el receptor NPY-Y1 en el NPV, la activación diferencial de las orexinas en el HL mediada por su receptor Ox1-R del NPV y la desregulación en la vía de señalización de leptina mediada por su receptor Ob-Rb directamente en NPV (103), entre otros.

La disminución en el consumo de alimento de las ratas AN observada en este estudio corresponde a lo reportado con anterioridad (67, 73, 99, 103) y confirma la aparición de una conducta anoréxica en los animales deshidratados. Es posible que puesto que los compartimientos de los fluidos están comprometidos, ya que el organismo no puede amortiguar su pérdida, los animales no consumen alimentos como un cambio adaptativo que asegura la supervivencia de los animales. Así, es menor la cantidad de agua necesaria para la digestión, la salivación, la motilidad intestinal y la ingestión de alimentos dependiente del ciclo circadiano; en cambio, se favorece el transporte de agua desde el intestino hacia el resto del cuerpo amortiguándose- los efectos de la hiperosmolemia (95, 98, 122, 123).

Tanto en animales RA como AN, el peso corporal disminuyó drásticamente en comparación con C, aunque no se observaron diferencias significativas a lo largo del experimento entre ambos grupos experimentales. Esto se puede deber a que ambos consumen la misma cantidad de alimento, y a que el peso del tejido adiposo subescapular (tejido adiposo pardo, BAT) y del tejido adiposo abdominal (tejido adiposo blanco, WAT) es similar tanto en RA como en AN (67), lo que apoya que presentan los mismos cambios metabólicos, como la disminución en la concentración de leptina. Esto también se observa en pacientes con anorexia nervosa, en donde hay una disminución marcada del tejido adiposo, el cual conlleva a la disminución de la concentración sérica de leptina (56).

El aumento en el consumo de líquido de los animales AN confirma el comportamiento de búsqueda de líquido que se ha reportado en estudios previos (67, 95, 124), donde se ha visto que dado que la única fuente de líquido es hipertónica, los animales desarrollaron gradualmente hipernatremia e hiperosmolemia, lo que se ha asociado con aumento de sed y activación de mecanismos que motivan el consumo de agua. Puesto que la solución salina es el único líquido disponible, la motivación por el consumo de agua se manifiesta en los animales AN (95, 98, 124).

### 6.1.2 *Paradigma Cepa Wistar Kyoto*

El peso de las ratas WKY fue menor que los animales CW a lo largo del experimento, coincidiendo con reportes anteriores (114, 125). La diferencia de peso corporal entre CW y WKY podría deberse a la desregulación del eje HHA característico de estos animales, ya que como se mencionó, la susceptibilidad a la hipercortisolemia podría

contribuir al desarrollo de la anorexia, aunque los mecanismos por los cuales se pudiera dar este efecto son desconocidos. Se sabe que el CRH tiene un efecto anorexigénico (10, 60, 61) y se ha medido su contenido en el hipotálamo en diversas cepas (Brown-Norway, Fisher 344, Lewis, espontáneamente hipertensas y Wistar Kyoto) mostrando que no hay cambios entre ellas (126); de la misma manera, la expresión del RNAm de *CRH* en el NPV de animales WKY no está incrementada, por lo que la disminución de la ingestión alimentaria, así como la desregulación del eje HHA se estarían dando por factores diferentes a CRH.

Es más probable que el menor peso que se observa en los animales WKY sea causado por alteraciones en el eje HHT; ya que, el aumento en la concentración de  $T_3$  (113) podría provocar un mayor gasto energético basal para los animales WKY (127, 128). Esto se daría gracias a la producción de energía en forma de calor por medio de las proteínas desacopladoras (UCP). Durante el proceso de síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa, se establece un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. Sin embargo, una proporción del gradiente de protones se fuga por las UCP's, lo que lleva a la generación de calor. Esto sucede principalmente en tejidos periféricos, como el tejido adiposo pardo (BAT) en los roedores o en músculo esquelético en roedores y humanos; cuando este proceso ocurre en condiciones basales se le llama termogénesis (127). La  $T_3$  actúa como factor de transcripción de los genes de las UCP's (*UCP1*, *UCP2*, *UCP3*), que se encuentran en el DNA mitocondrial, regulando de esta manera la termogénesis y la tasa metabólica (90, 129). Como los animales WKY presentan una concentración sérica mayor de  $T_3$ , ésta podría significar que la termogénesis y la tasa metabólica basal de los WKY son mayores a las CW y

que los WKY se encontrarían en balance energético negativo, teniendo un peso corporal menor a las CW.

Además de que los animales WKY tuvieron menor peso corporal que los CW, su consumo alimentario estuvo disminuido en los días 3 y 5 vs CW. Esto podría explicarse por la disminución en la concentración sérica de grelina (hormona gastrointestinal orexigénica) que presentan los animales WKY, en comparación con la de los Wistar wild type (130). De hecho, los animales WKY ayunados no presentan un incremento de la concentración sérica de grelina, lo que sí se observa en los animales Wistar wild type ayunados, sugiriendo que las células que sintetizan grelina (células A) en animales WKY, no son sensibles a estímulos como la disminución de la ingestión alimentaria (125).

Otra posible causa sería la alteración en la expresión de péptidos que regulan el balance energético; por ejemplo, la hormona gastrina que se sintetiza en el tracto gastrointestinal (células G de la mucosa del antro gástrico) (131) y su liberación se encuentra regulada por el péptido liberador de gastrina (GRP), entre otros factores (132), quien a su vez se sintetiza en diversas regiones del SNC (133, 134), como el hipotálamo, incluyendo a la región medial parvocelular del NPV (135). Se ha propuesto que la gastrina está relacionada con la regulación de la conducta alimentaria, ya que su contenido sérico se encuentra disminuido en animales con restricción alimentaria (125), por lo que podría tener un efecto anorexigénico. La concentración sérica de la hormona gastrina está incrementada en ratas WKY al compararla con las Wistar wild type (125), lo que contribuiría a la disminución de la ingestión alimentaria de animales WKY.

Por otra parte, puede ser que haya alteraciones en la expresión del péptido GRP, ya que se le ha implicado en la regulación de la ingestión alimentaria y el balance energético, en donde la restricción alimentaria disminuye la expresión del RNAm de *GRP* (136). Por lo que al ser un péptido sintetizado en el NPV, lo propone como un candidato a ser estudiado como uno de los posibles factores que puedan estar causando la conducta de anorexia en animales WKY.

Otro factor que podría estar involucrado con el menor consumo alimentario de los animales WKY son las orexinas, específicamente la orexina A, la cual se ha vinculado con la regulación de la conducta alimentaria induciendo en animales un mayor consumo de alimentos (orexigénico) (137, 138). Los animales WKY presentan disminución tanto en el contenido del péptido de orexina A como en el RNAm de *prepro-orexinas* en el hipotálamo lateral anterior y posterior en comparación con animales Wistar wild type, así como en otras áreas involucradas en la regulación de la conducta alimentaria como la amígdala (139); por lo que la disminución en la expresión y contenido de orexina A podría estar influenciando el menor consumo de alimentos de los animales WKY.

Los animales sometidos a estrés por deshidratación muestran claros signos del desarrollo de una conducta de anorexia, evidenciado por la disminución "voluntaria" del consumo de alimento y por la pérdida de peso al comparar con los de RA. Por otra parte, los animales WKY tienen menor peso corporal y consumo de alimento de manera basal, aunado a un eje HHA desregulado, que suele subyacer la aparición de anorexia nervosa, por lo que es factible que esta cepa pudiera ser utilizada como un modelo "natural" de la anorexia.

## 6.2 Cambios en el eje HHA

### 6.2.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

El contenido sérico de corticosterona en animales AN y RA aumentó respecto al de los controles, lo que coincidió con lo reportado anteriormente (73, 99, 103). Este aumento significa que la anorexia está siendo inducida por el estrés por deshidratación, y que el modelo respondió conforme a lo esperado, basándonos en estudios previos (67, 73, 99, 103). Esto además concuerda con las alteraciones endócrinas que presentan los pacientes con anorexia nervosa, tales como una desregulación del eje HHA, observándose hipercortisolemia, aunque la elevación en la concentración de cortisol también puede estar elevada en orina y saliva en comparación con controles saludables (140, 141). Diversos estudios se han enfocado en dilucidar en qué punto del eje HHA ocurre la desregulación. A pesar de que la respuesta de ACTH a CRH está disminuida e indica el buen funcionamiento de la retroalimentación negativa a nivel de la adenohipófisis, la concentración basal normal de ACTH (la cual debería estar disminuida) y la falla de la dexametasona (glucocorticoide sintético) para suprimir completamente la producción de cortisol, sugieren una alteración en la retroalimentación negativa o en su punto de control (set point) en el hipotálamo (141, 142).

La prevalencia de comorbilidades en pacientes con anorexia, incluyendo trastornos de depresión y ansiedad (57), aunado a la elevada concentración de CRH en el líquido cerebroespinal, sugieren la alteración del eje HHA por un mecanismo central que puede deberse a CRH (143). La desregulación del eje HHA se revierte parcialmente con la

ganancia de peso de pacientes con anorexia, sugiriendo que la susceptibilidad subyacente a la hipercortisolemia contribuya al desarrollo de la anorexia (141).

El incremento en la concentración de corticosterona en animales RA y AN pudo deberse a la disminución en la tasa catabólica de glucocorticoides en el hígado, dada la reducción de la actividad de la enzima 4,5-dihidro corticosterona: NADP<sup>+</sup> delta 4-oxido reductasa (144), que se presenta en condiciones de balance energético negativo (145-148). Ya que ambos grupos experimentales presentaron el aumento de la concentración sérica de corticosterona, éste no pudo ser un factor determinante para la falta de motivación por el consumo de alimento en animales AN; tampoco se le pudo atribuir la expresión diferencial de TRH, a pesar de que la corticosterona regula negativamente su expresión en el NPV (69, 149).

Los glucocorticoides (GC) pueden regular la expresión génica de manera independiente a la unión con el DNA (elemento de respuesta a glucocorticoides, GRE) vía la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción, como el factor de transcripción STAT (activador de la transcripción y transductor de señales) (150). Dado que el promotor del gen *CART* tiene un sitio de unión para el factor de transcripción STAT (151), es posible que los GC regulen la expresión de *CART* por este mecanismo, interfiriendo en la acción de STAT.

El hecho de que existan receptores de glucocorticoides (GR) en el ARC e HL (152), y que su RNAm co-localice con el de *POMC* y *CART* en esos núcleos (153, 154) sugiere que la corticosterona podría participar en la modulación de la expresión de *CART*.

Evidencia en favor de esta propuesta es el hecho de que la administración intraperitoneal (i.p.) de corticosterona aumenta los niveles del péptido CART en sangre (155), y la adrenalectomía reduce la expresión del RNAm de *CART* en ARC y NPV (156, 157). Sin embargo, nuestros animales AN y RA presentaron un incremento similar de contenido sérico de corticosterona, por lo tanto no sería factible que dicha hormona fuera responsable de la expresión diferencial de *CART* en ARC e HL de animales con AN, por lo que otros factores podrían estar involucrados, como una posible expresión diferencial de los receptores de GC en ARC e HL y la leptina.

#### 6.2.2 *Paradigma Cepa Wistar Kyoto*

Se sabe que las ratas WKY son una cepa con un perfil sensible a estrés que afecta su función conductual, endócrina y autonómica (158). El fenotipo de los animales WKY está caracterizado por aumento en la concentración sérica de ACTH en respuesta a estrés y resistencia del eje HHA a la retroalimentación por glucocorticoides (111, 159). Además, las ratas WKY son más susceptibles a desarrollar úlceras inducidas por estrés por inmovilidad que las Wistar wild type (160, 161), sugiriendo que también las respuestas autonómicas al estrés están elevadas. Finalmente, se ha propuesto a la cepa WKY como susceptible a la depresión (cuyo desarrollo también está asociado a la hiperactividad del eje HHA), ya que adoptan diversas conductas pasivas en diferentes situaciones, tales como falta de exploración en la prueba de campo abierto, inmovilidad en la prueba de nado forzado, rápida adquisición de la desesperanza aprendida e inmovilidad en el modelo de enteramiento defensivo (162-164). Todo esto propone a las ratas WKY como un modelo de depresión relacionado al estrés. Esto es importante, ya

que se ha encontrado que la alteración de la conducta alimentaria en pacientes con anorexia, subyace a otros padecimientos psiquiátricos, entre ellos la depresión (57).

Las alteraciones observadas en el eje HHA de animales WKY, coinciden con aquéllas presentes en pacientes con anorexia y con hipercortisolemia, sobre todo en la falta de respuesta del eje HHA a la retroalimentación negativa por glucocorticoides. Esto se ha apoyado por el incremento en la secreción y concentración de ACTH tanto en la cepa WKY como en individuos anoréxicos (114, 115). Puesto que el funcionamiento del eje HHA depende de proyecciones aferentes de la amígdala y de la estría terminal (BNST), donde la expresión de *CRH* es abundante (165), no podemos descartar la participación del péptido de regiones límbicas en las alteraciones endócrinas y en las respuestas de estos animales al estrés. *CRH* aumenta en un núcleo cercano a *locus coeruleus* (158), por lo que sería interesante determinar la expresión del RNAm de *CRH* en otros núcleos, como la amígdala y la estría terminal (BNTS), que podrían estar participando en la desregulación del eje HHA de animales WKY.

La condición de anorexia en animales AN y la reducción en el consumo alimentario coinciden con el aumento de la concentración sérica de GC. Sin embargo, serían necesarios experimentos de adrenalectomía para evidenciar su efecto. Por otro lado, aunque los GC no parecen responsables de los cambios en la expresión de péptidos hipotalámicos de AN (ya que RA también presenta el incremento de GC), no se puede descartar que la síntesis, el número y/o la afinidad de los receptores de glucocorticoides (GR) en el ARC, en el NPV o en el HL estén alterados diferencialmente entre AN y RA. Los animales WKY presentan una mayor concentración sérica de GC, aunado a que

son una cepa susceptible a la depresión y ansiedad, por lo que probablemente las alteraciones que sucedan, tanto en el eje HHA como en la conducta (trastornos psiquiátricos) sean a nivel central.

### 6.3 Cambios en el eje HHT

#### 6.3.1 Paradigma Anorexia por deshidratación

En este estudio analizamos los cambios en parámetros del eje tiroideo que nos permitieran reproducir alteraciones encontradas anteriormente en los animales con deshidratación y asegurarnos de su respuesta, según lo reportado (67, 73, 103). Sabiendo que el RNAm de *CART* co-localiza con el de *TRH* en las neuronas hipofisiotrópicas que regulan el eje HHT (166, 167), resolvimos analizar cambios en la concentración sérica de HT y TSH. Esto podría tener efecto sobre la expresión de *CART* de las neuronas hipofisiotrópicas.

El eje HHT en respuesta a estresores ambientales o bajo algunas condiciones patológicas, ajusta su punto de control por retroalimentación ejercido por las hormonas tiroideas (66). Esto, como una manera de mantener la homeostasis ante las circunstancias de baja disponibilidad de alimentos (67-70, 72, 73, 168-170).

Los animales RA mostraron hipotiroidismo terciario, como se ha reportado, causado por la reducida ingestión de alimentos. Este hipotiroidismo se caracteriza por la disminución en la concentración sérica de TSH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> (medidos en este trabajo) así como por la disminución de la expresión del RNAm de *pro-TRH* en NPV (67, 69, 70, 73, 103);

además, por un aumento en el contenido de TRH en la eminencia media, lo que evidencia que su liberación se encuentra inhibida (68-70, 168, 169). El ayuno y la restricción alimentaria son condiciones que regulan de manera negativa la expresión de *pro-TRH* en NPV (69, 70, 72), sin importar que la concentración de las HT esté disminuida, por lo que la retroalimentación negativa del eje HHT se bloquea (88). Estos cambios conforman una respuesta adaptativa que lleva a reducir la termogénesis, disminuir la degradación de las reservas energéticas (171-173) y favorecer la sobrevivencia de los animales.

Al contrario de lo que ocurrió en los animales en restricción forzada de alimentos RA, los AN mostraron hipotiroidismo primario (disminución del contenido sérico de las HT), lo que mostró la incapacidad de adaptación de su eje HHT a nivel hipotalámico a pesar de la deficiencia de nutrientes; además de la reducida concentración sérica de  $T_3$  y  $T_4$ , el hipotiroidismo se reconoció por el aumento del contenido de TSH, de la expresión de *pro-TRH* en NPV (67, 73, 103) y el incremento en la liberación de TRH (menor contenido en las terminales nerviosas del NPV) (67). A pesar de que la concentración de TSH aumentó, el contenido de las HT disminuyó, lo que puede estar relacionado con el aumento de la internalización del receptor para TSH en la glándula tiroides después de la deshidratación, precisamente por el elevado contenido sérico de tirotrópina. Esto se ha demostrado en estudios de hipotiroidismo *in vitro* e *in vivo* (que se presenta con aumento en el contenido de TSH), donde la unión del péptido al receptor disminuye en más del 50% (174, 175). La elevación en la concentración sérica de TSH en AN pudo deberse al aumento del RNAm de *pro-TRH* observado en la región posterior del NPV (100), cuyas neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas (77), activarían la síntesis de TSH.

# BIBLIOTECA UACM

Ahora se conoce que el aumento en la expresión de pro-TRH del NPV de animales deshidratados se presenta en la región anterior y posterior del NPV (100) y que las neuronas de la región posterior son hipofisiotrópicas, lo que apoya que la liberación de TSH en esos animales resulta del incremento en la expresión y liberación de *TRH*.

## 6.3.2 *Paradigma Cepa Wistar Kyoto*

Los animales WKY presentaron concentraciones séricas elevadas de TSH y  $T_3$ , lo cual coincide con la descripción del fenotipo tiroideo de animales WKY, donde también se ha caracterizado la concentración sérica normal de  $T_4$  (113). El aumento en la concentración sérica de TSH y  $T_3$  pareció ser independiente de TRH, ya que el contenido de su RNAm en NPV es similar al de los animales Wistar wild type (176). Es posible que el aumento de la concentración sérica de TSH y  $T_3$  de animales WKY se deba a una insensibilidad de las neuronas hipofisiotrópicas del NPV del hipotálamo (evidenciada porque las HT no reducen TRH), lo que afectaría la retroalimentación negativa; además de que los animales WKY presentan activación del eje HHT en estado basal con respecto a las Wistar wild type. Esto se respalda en estudios donde la administración de la misma concentración de HT ( $T_4$  en el agua, administración i.p. de  $T_3$ ), las cuales tienen actividad similar a antidepresivos, no tienen el mismo efecto en animales WKY y Wistar wild type sometidas a pruebas de depresión (nado forzado). En las ratas wild type se reduce la inmovilidad (parámetro para medir la depresión), mientras que en las WKY no se observa un efecto (113); por lo que podría haber insensibilidad a nivel del SNC.

Como el contenido sérico de TSH y  $T_3$  están incrementados en las ratas WKY, es posible que se necesite mayor concentración de  $T_3$  para regular negativamente a TSH; esto está apoyado en estudios de hipotiroidismo e hipertiroidismo inducido en animales WKY. En el hipotiroidismo inducido (administración de propiltiouracilo, PTU; tiroidectomía) en WKY, donde la concentración de las HT disminuye marcadamente, se observa un aumento de TSH sérica el cual es mucho mayor que en las WKY eutiroideas (sin tratamiento) y el hipertiroidismo por administración de  $T_4$  y de  $T_3$  en WKY, donde la concentración de las HT aumenta significativamente, disminuye la concentración de TSH a valores menores que en las eutiroideas (113), mostrando que el punto de control (set point) del eje HHT por HT en animales WKY presenta un umbral mayor o menor, según sea el caso.

El aumento de la concentración sérica de TSH en animales WKY, tendría que llevar a un aumento de la concentración de  $T_4$ , pero esto no se observa. Esto podría deberse al desarrollo de una condición de resistencia a TSH, la cual se puede dar debido a mutaciones en el gen del receptor de TSH (*TSHR*), que se ha observado en humanos que padecen resistencia a TSH y tienen el contenido sérico de  $T_4$  normal (177). De la misma manera se han encontrado 3 alteraciones en la secuencia de la región codificante del gen *TSHR* en rata, siendo dos de ellas específicas de las ratas WKY en comparación con la secuencia publicada (cepa FRTL-5/Fisher). Cambios reportados en humanos relacionados con los mismos aminoácidos, indican que esas alteraciones en el gen *TSHR* en animales WKY podrían inactivarlo parcialmente y por lo tanto causar la resistencia a TSH (178).

También se han encontrado alteraciones en la región 3'UTR del gen de la *desyodasa I* [*D1*, responsable de la transformación de  $T_4$  en  $T_3$  y  $T_3$  reversa ( $rT_3$ ) en tejidos periféricos (179)] en WKY (178). Dichas alteraciones pueden ser importantes, ya que se han caracterizado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) en la región 3'UTR del gen *D1* de humanos que están asociados con alteraciones en las tasas de hormonas tiroideas en plasma (180). Si esto ocurre en la rata, entonces podría estar relacionado con el patrón alterado de la relación de  $T_4/T_3$  en animales WKY.

De la misma manera se encontraron alteraciones en la región 3'UTR del gen de la *desyodasa II* [*D2*, responsable de la transformación de  $T_4$  en  $T_3$  (responsable del 25% de  $T_3$  plasmática (179))] de animales WKY (178), que podría afectar la traducción o la actividad enzimática de la proteína, o alterar la estructura del RNAm, su estabilidad o su plegamiento, llevando a las alteraciones observadas en la concentración sérica de hormonas tiroideas. Es importante considerar que ninguna de las alteraciones que se presentan en un solo gen (*TSHR*, *D1*, *D2*) podría explicar las diferencias de los animales WKY vs CW, y que es posible que alteraciones en un gen no identificado asociado al fenotipo tiroideo de los animales WKY (178) pudiera contribuir a las alteraciones observadas.

Tanto los animales AN como los WKY presentan una expresión de TRH elevado o sin cambio, respectivamente, a pesar de encontrarse en balance energético negativo de energía. Esto contrasta con el esperado decremento de TRH que se observa en restricción alimentaria, ayuno y desnutrición, y apoya el papel anorexigénico del péptido en NPV. En conclusión, la alteración del eje HHT de ambos AN y WKY es central y

probablemente está relacionada con su desmotivación por el consumo de alimentos (la región anterior del NPV tiene proyecciones hacia el ARC).

Ambos grupos de animales presentaron incremento en el contenido sérico de TSH, que es paradójico puesto que se encuentran en déficit de nutrientes. Además, presentaron disminuida o normal la concentración de  $T_4$ , respectivamente, evidenciando una menor respuesta de la tiroides a la tirotrópina. En ambos parece haber una resistencia a TSH, quizá por alteración de los receptores. En cambio, la concentración de  $T_3$  fue diferente (disminuida en AN e incrementada en WKY), lo cual puede tener relación con alteraciones diferenciales en la actividad de desyodasas.

En conclusión, la disminución en el peso corporal no parece ser debida a los cambios en la concentración sérica de  $T_3$ . Ya que a pesar de la concentración disminuida de  $T_3$  en AN, estos animales bajan de peso considerablemente, lo que puede deberse a una mayor concentración local de esta hormona en los músculos (mayor actividad de desyodasas). Por el contrario, el incremento de  $T_3$  en WKY, no parece afectar importantemente el peso de los animales, ya que solo reducen un 15% vs las CW, lo que indica que podría haber alteración de los receptores tiroideos.

## 6.4 *Leptina*

### 6.4.1 *Paradigma Anorexia por deshidratación*

La leptina es una hormona secretada por los adipocitos en relación a la masa grasa corporal, y que informa a las neuronas del ARC de la situación de las reservas

energéticas que se tienen (5, 181), suprimiendo la ingestión alimentaria y permitiendo el gasto energético (182). La leptina activa directamente a las neuronas que sintetizan péptidos anorexigénicos (POMC/CART), e inhibe a aquéllas que sintetizan péptidos orexigénicos (NPY/AgRP) en el ARC, provocando una disminución en la ingestión alimentaria (183); así, la leptina se considera una hormona anorexigénica.

Durante el ayuno y la restricción alimentaria, el contenido sérico de leptina disminuye (61), activándose las neuronas NPYérgicas del ARC que liberan NPY en el NPV principalmente (18, 184-187), lo que estimula la conducta de búsqueda de alimento en los animales.

La concentración sérica de leptina disminuyó de manera similar tanto en RA como en AN vs C; lo que ya se ha observado en estudios previos (67, 73, 99). Esta disminución aunada al aumento de la expresión de *NPY* en ARC en ambos grupos experimentales (99), sugiere que la aparición de la conducta de anorexia en animales AN no es debida a una falla en la respuesta de las neuronas NPYérgicas a la disminución del contenido de leptina. De la misma manera, la disminución similar de la concentración sérica de leptina en ambos grupos experimentales no podría estar involucrada en los cambios en la expresión de *CART* en NPVa, ARC e HL, que fueron diferenciales entre AN y RA.

La disminución de la concentración de leptina también se ha reportado en pacientes con anorexia, que está correlacionada con la disminución del índice de masa corporal (IMC) y con la cantidad de grasa corporal (62). De hecho, la cantidad de grasa corporal, tanto la parda (BAT) como la blanca (WAT), disminuyen de manera similar en RA y AN

(67), mostrando que ambos grupos presentan los mismos cambios metabólicos. La concentración de leptina se restablece con la ganancia de peso e incluso puede llegar a concentraciones más altas que las de sujetos sanos (188). Por lo que el modelo de anorexia por deshidratación refleja los cambios en el peso corporal, de la masa grasa y de la concentración de leptina que se presentan en pacientes con anorexia.

Por otra parte, se ha reportado que en animales AN la expresión del RNAm de *ObRb* en el NPV no aumenta como en los animales RA lo que facilita que censen la poca concentración de leptina (103). En la adenohipófisis también se ha identificado la expresión del RNAm de *leptina* y de su receptor *ObRb*, específicamente en tirótrofos (189-192), donde la hormona actúa inhibiendo la secreción de TSH y funcionando como un regulador autócrino/parácrino de TSH (193). Así, no podemos descartar que la disminución de la leptina repercuta sobre la liberación de TSH, incrementándose en los animales AN.

#### 6.4.2 Paradigma Cepa Wistar Kyoto

En los animales WKY se observó que la concentración sérica de leptina disminuyó a niveles indetectables; esto no correlaciona con la cantidad de grasa corporal que presentan los animales, ya que el peso del tejido adiposo blanco (WAT) es similar en animales CW y WKY. Aunque teóricamente la disminución del contenido sérico de leptina activaría la vía orexigénica (NPY/AgRP) hipotalámica e inhibiría a la anorexigénica (POMC/CART) (187), los animales WKY mostraron menor consumo de alimento vs los CW. Es factible entonces que la vía de señalización de la leptina hacia

el ARC esté defectuosa, o bien que la de NPY y de POMC hacia el NPV o hacia el HL, esté alterada.

La leptina estimula la liberación de TSH de manera indirecta por su acción sobre el hipotálamo (ya que aumenta la liberación de TRH) pero al mismo tiempo inhibe directamente su liberación, actuando en la adenohipófisis (193). La disminución en la concentración de leptina podría estar relacionada indirectamente con el aumento en la concentración de  $T_3$  de animales WKY por el efecto que ejerce sobre TSH, ya que no se estaría llevando a cabo la regulación negativa de la leptina sobre los tirótopos en la adenohipófisis. En sentido contrario, es posible que el aumento de  $T_3$  contribuya al indetectable contenido de leptina, ya que la administración sistémica de  $T_3$  inhibe la producción de leptina en ratas (194). Esto también se ha demostrado *in vitro* en un cultivo celular primario de tejido adiposo blanco o pardo de rata, donde la administración de  $T_3$  inhibe la síntesis de leptina (195).

Los humanos con deficiencia congénita de leptina presentan alteraciones en el eje HHT, aunque los cambios entre pacientes con deficiencia de leptina son controversiales, observándose concentraciones séricas variables de  $T_4$ ,  $T_3$  y TSH (196). Es posible entonces, que la deficiencia de leptina observada en animales WKY esté relacionada con el fenotipo tiroideo de estos animales, aunque es necesario realizar un mayor número de estudios para corroborarlo.

La leptina bloquea directamente la producción de glucocorticoides a nivel de la glándula adrenal (197); posiblemente la falta de leptina impide el bloqueo de la producción de

corticosterona, observándose una concentración sérica más elevada en animales WKY. Por otra parte, los GC causan elevación de la concentración sérica de leptina de manera crónica, como resultado del incremento de la adiposidad corporal (198-201), pero esto no se observa en las ratas WKY, ya que no hay más tejido adiposo ni mayor concentración de leptina, por lo que estas evidencias sugieren que en animales WKY se encuentra alterada la vía de GC a nivel de su receptor en tejido adiposo.

La disminución de la concentración sérica de leptina podría contribuir al aumento de TSH sérico en ambos grupos. Esto es una evidencia de que los animales están en balance negativo de energía. Puesto que su acción es anorexigénica, es factible que su vía de señalización al ARC o al NPV esté alterada (se ha descrito para AN) también en WKY.

## 6.5 *Expresión de CART en el hipotálamo*

### 6.5.1 *Paradigma Anorexia por deshidratación*

La disminución de la expresión del RNAm de *CART* en NPVa de los animales RA pudo deberse a una respuesta hacia el balance energético negativo, ya que la concentración sérica de leptina se encuentra disminuida, lo que inhibiría la expresión de *CART* en el NPV directamente; esto se apoya en la presencia de receptores a leptina en las células de dicho núcleo que expresan *CART* (202). Esto no se observa en animales AN, por lo que probablemente la señalización de la leptina se encuentra afectada, lo que ya se ha observado en animales AN, donde la expresión del receptor no responde como lo hace en los animales RA (aumenta la expresión del RNAm de *ObRb*) (103). Al no

incrementarse la expresión de *ObRb* en respuesta a la baja concentración de leptina en animales AN, habría una menor señalización de leptina, y ésta no inhibiría la expresión de CART. Es conocido que el promotor del gen *CART* tiene un sitio de unión al factor de transcripción STAT (151), el cual es activado en la cascada de señalización de la leptina (203), por lo que sería posible que el efecto de la leptina (si es que ésta fuera responsable) sobre la transcripción de CART (en RA) se dé por medio de este factor.

El NPV es un núcleo hipotalámico que integra señales provenientes de diversas regiones del cerebro relacionadas con la regulación de la homeostasis energética, como ARC y NTS (20) y también señales endócrinas periféricas (insulina, leptina, grelina, CCK). De la misma manera, la región anterior del NPV (NPVa) contiene una población neuronal que sintetiza TRH que proyecta hacia regiones que participan en la regulación de la conducta alimentaria, como el ARC y la amígdala (101). Estos datos podrían sugerir que la población neuronal que sintetiza CART en el NPVa también estaría involucrada en la regulación de la conducta alimentaria. Esto se apoya por la existencia de proyecciones de esta región hacia el complejo vago-dorsal (204), que incluye al NTS y al que se le han atribuido funciones relacionadas con la saciedad (205). Por lo que la falla en la disminución del RNAm de *CART* en el NPVa de animales AN podría estar causando una mayor señalización hacia las regiones mencionadas y provocar mayor saciedad en estos animales, afectando de esta manera la conducta alimentaria. No se tienen más datos que la evidencia anatómica, por lo que es necesario realizar estudios enfocados en estudiar el papel de CART en estas regiones cerebrales.

En las regiones NPVm y NPVp no se observaron cambios en la expresión del RNAm de *CART* entre grupos experimentales ni contra los animales control, por lo que *CART* de estas regiones no estaría involucrado en las alteraciones de la conducta alimentaria que se observan en animales AN. Esto apoya que *CART* sólo modula el efecto de TRH sobre la adenohipófisis para liberar prolactina, mientras que no tiene influencia en la liberación de TSH inducida por TRH en condiciones de balance negativo de energía (206, 207).

En HL y ARC de animales RA se observó disminución de la expresión del RNAm de *CART*, lo que ya se ha observado en ARC de animales ayunados por 24 o 48 h (16), los cuales presentan aumento de expresión de *NPY* y *AgRP* así como la activación de la conducta de búsqueda de alimento; también se ha observado que la expresión del RNAm de *CART* en la región del hipotálamo dorsomedial/hipotálamo lateral en animales ayunados por 48 h muestra una tendencia a disminuir, aunque no se alcanza la significancia estadística (16), por lo que es posible que se necesite de un ayuno de más tiempo o de una restricción alimentaria semi-aguda para que la disminución de *CART* sea significativa; tal es el caso de este estudio, en el que la expresión del RNAm de *CART* en animales RA disminuyó al 7° día. Estos cambios coinciden con el papel anorexigénico propuesto para *CART*; su disminución en RA favorecería el consumo de alimentos.

En contraste, la expresión de *CART* del ARC e HL no tiene cambio en los animales con AN. Aunque estas neuronas están reguladas por leptina (16), su señalización parece defectuosa, ya que la disminución del contenido sérico de la hormona debería inducir

inhibición de la síntesis de CART, tal como sucedió en RA. Es factible que la expresión del receptor de leptina del ARC y/o HL esté alterado como ya se ha detectado en NPV (103).

Otra posible causa de que no cambie la expresión del RNAm de *CART* en HL de animales AN podría ser una respuesta adaptativa a la deshidratación, ya que se ha implicado al HL como un importante regulador del balance entre fluidos y nutrientes (208). Esto se explica por la evidencia de que en respuesta a estrés hiperosmótico, como el que ocurre en la privación de agua o en el consumo de una carga de sal, hay disminución en la expresión del RNAm de la *hormona concentradora de melanina (MCH)* en el HL (209), el cual es un péptido con acción orexigénica. Así, no se favorece el consumo de alimentos sino la utilización de reservas energéticas. Por otro lado, existe co-localización de los RNAm de *CART* y *MCH* en HL (166, 210), lo que apoya que el HL tiene una respuesta diferencial al balance negativo de energía cuando es inducido por deshidratación, que podría actuar como un mecanismo de adaptación, donde se inhibe la vía orexigénica de MCH y se activa la anorexigénica de CART.

El hecho de que la expresión de *CART* no disminuya en el ARC de animales AN, podría tener efecto supresor sobre la acción orexigénica de NPY [cuya expresión está incrementada en AN y RA (99)]; esto se apoya en que la inyección i.c.v. de CART suprime el efecto orexigénico de NPY en animales no ayunados y ayunados por 24 h, a los cuales a su vez se les administró i.c.v. NPY (16); además se ha observado que el estrés hiperosmótico tiene efecto temprano sobre las vías anorexigénicas

(activándolas), y sólo a tiempos más largos se alteran las orexigénicas. Es decir, no es trivial la falta de reducción de la síntesis de CART en animales AN (211).

Existen conexiones aferentes del ARC y del NPV hacia el HL (26), por lo que podríamos especular que la expresión diferencial de *CART* en HL entre RA y AN (RA disminuyó vs C y AN) podría darse por la mayor señalización anorexigénica proveniente de ARC y NPVa, para que de esta manera la expresión del RNAm de *CART* en HL de animales AN no disminuya como se esperaba que sucediera. Además, se ha sugerido que la expresión neuropeptidérgica del HL puede ser modulada diferencialmente por la variedad de fibras aferentes que posee, provenientes de regiones cerebrales osmosensibles (núcleo preóptico medial, órgano subfornical, BNST). Éstas responden al incremento en la osmolalidad plasmática (26, 212), regulando la conducta alimentaria en diversas circunstancias, generando anorexia en algunos casos.

En HL, además, la expresión del RNAm de *CRH* y de *orexinas* aumenta y disminuye, respectivamente en animales AN vs la de controles y RA (99, 103, 213); estas alteraciones están relacionadas con la aparición de la anorexia en animales deshidratados; por lo que se propone a este núcleo como el más implicado en la generación de la anorexia en el estrés por deshidratación.

#### 6.5.2 Paradigma Cepa Wistar Kyoto

En los animales WKY se encontró aumento de la expresión del RNAm de *CART* en las 3 regiones del NPV (NPVa, NPVm, NPVp), sin mostrar ningún cambio en ARC e HL vs CW. Puesto que las HT afectan negativamente la expresión de *CART*, el incremento del

contenido sérico de estas hormonas debería inhibir su expresión (214); esto pareciera indicar que la expresión de los receptores de HT o su función estuviera alterada sólo en el NPV y no en ARC e HL (215) en WKY, sin embargo habría que profundizar sobre esto. Hubiéramos esperado que la disminución en la concentración sérica de leptina disminuyera a su vez la expresión de *CART* en el NPV de WKY, ya que se sabe que la disminución de la concentración sérica de leptina estimula las vías orexigénicas e inhibe las anorexigénicas, aunque paradójicamente sucede lo contrario, por lo que otros factores estarían involucrados para alterar la síntesis de *CART* en animales WKY, y los cuales a su vez también podrían estar implicados en el menor peso corporal y consumo de alimento de animales WKY.

Si el aumento en la expresión de *CART* en el NPV estuviera activando su liberación entonces podría ser responsable indirecto de la disminución de la concentración sérica de leptina en WKY. Esto sería a través de la acción de *CART* sobre la liberación de prolactina, y de la de prolactina sobre la síntesis de leptina. Aunque no se han realizado estudios dirigidos a dilucidar el papel de la prolactina sobre la síntesis de leptina, suponemos que pueden estar relacionados. Esto se apoya en que la administración tanto central como periférica de *CART*, aumenta la liberación de prolactina de animales WKY macho (216); este aumento podría incrementar la fosforilación del supresor de la señalización de citocinas (SOCS) y suprimir a su vez la fosforilación de STAT, por lo que la prolactina podría suprimir la vía de la leptina (217), inhibiendo su síntesis en el tejido adiposo. La prolactina podría interferir con la señalización de los receptores a leptina del tejido adiposo (218); así, se alteraría la producción de leptina en el tejido adiposo blanco y pardo sólo en WKY.

La expresión del RNAm de *CART* por RT-PCR no mostró cambios entre CW y WKY en NPV, ARC, ni en HL. Sólo cuando analizamos la expresión de las células de las diferentes áreas dentro del NPV (NPVa, NPVm y NPVp) por hibridación *in situ*, encontramos un patrón diferencial en la expresión del RNAm de *CART* entre grupos. Así, pudimos reconocer que las células que expresan *CART* en el NPV de los animales WKY son especializadas y su participación en la regulación de la conducta alimentaria involucra diferentes aspectos.

El hecho de que la expresión del RNAm de *CART* del NPVa, HL y ARC de animales AN no disminuya como sucede en los animales RA, sugiere que la síntesis de este péptido anorexigénico en estas regiones podría estar involucrada en la aparición de la conducta de anorexia en animales deshidratados. Por el contrario, en animales WKY hay aumento en la expresión del RNAm de *CART* en NPVa, NPVm y NPVp, por lo que una alteración en la regulación de la expresión de *CART*, específicamente en NPV, podría ayudar a generar la conducta tipo anorexia de estos animales.

Al comparar ambos modelos de anorexia, se puede concluir que la vía anorexigénica de *CART* se encuentra regulada de manera distinta bajo distintos factores como estímulos ambientales y perfiles genéticos, entre otros, aunque la conducta de anorexia se presente en ambos. También podemos concluir que la anorexia se puede dar debido a alteraciones en diferentes vías tanto neuropeptidérgicas como endócrinas; lo que significa que la aparición de la conducta de anorexia se puede dar por la interacción de diversas alteraciones y en diversos sistemas.

## 6.6 Conclusiones y Perspectivas

- La vía de CART del NPV parece participar en la conducta de anorexia presentada tanto por los animales deshidratados como en la cepa Wistar Kyoto.
- Las regiones involucradas con alteraciones en la vía de CART son diferentes en ambos modelos, lo que apoya la redundancia de sistemas regulatorios de la conducta alimentaria.
- El hipotálamo lateral parece ser uno de los núcleos de esta zona más afectados e involucrados en el despliegue de la conducta de anorexia en la deshidratación.
- Ambos modelos de anorexia presentan cambios neuroendócrinos, lo que resulta de interés para el estudio de alteraciones metabólicas y diseño de acciones terapéuticas para pacientes con ésta conducta, así como su utilización como marcadores de la enfermedad.
- La cepa Wistar Kyoto podría utilizarse como un modelo de simulación de la anorexia. Se podría cumplir el criterio de la validez aparente y de constructo donde algunos parámetros metabólicos (pérdida de peso, disminución del consumo corporal, disminución del tejido adiposo), endócrinos (aumento de la función del eje HHA, disminución de la concentración de leptina) y neuroquímicos (alteración en vías orexigénicas y anorexigénicas) serían semejantes a lo que sucede en pacientes con anorexia nervosa. La validez predictiva ya se ha demostrado por medio de ensayos con antidepresivos y ansiolíticos en WKY, aunque no se ha estudiado su efecto en el peso corporal o el consumo alimentario, por lo que aún falta por estudiar ese efecto.

- La deshidratación afecta diferencialmente las neuronas de CART de núcleos hipotalámicos, lo que indica que los aspectos de la conducta alimentaria en que participa son diversos.
- Las alteraciones del eje HHT que se observan en ambos modelos, pueden deberse a un mecanismo adaptativo (anorexia por deshidratación) o pueden estar favoreciendo la conducta de anorexia (cepa Wistar Kyoto).
- Además de que en éste trabajo se midió la expresión del RNAm de *CART*, se propone, en estudios posteriores, la detección del contenido del péptido *CART* para confirmar que las alteraciones observadas también se trasladan al péptido.
- Se ha propuesto el estudio de asociación de diversos genes, entre ellos *CART* (219), el cual estaría justificado, ya que en este trabajo se encontró alteración en la expresión del RNAm de *CART* en dos modelos de anorexia.

## VII. Referencias Bibliográficas

1. Smith PM and Ferguson AV. Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev Disabil Res Rev* 2008; 14(2):96-104.
2. Fry M, Hoyda TD, Ferguson AV. Making sense of it: roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232(1):14-26.
3. Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005; 184(2):291-318.
4. Bailer UF and Kaye WH. A review of neuropeptide and neuroendocrine dysregulation in anorexia and bulimia nervosa. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2(1):53-9.
5. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404(6778):661-71.
6. Chaudhri O, Small C, Bloom S. Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361(1471):1187-209.
7. Williams DL and Cummings DE. Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 2005; 135(5):1320-5.
8. Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26(4):393-428.

9. Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 2001; 74(4-5):683-701.
10. Hillebrand JJ, de Wied D, Adan RA. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 2002; 23(12):2283-306.
11. Schwartz MW. Brain pathways controlling food intake and body weight. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001; 226(11):978-81.
12. Leibowitz SF and Wortley KE. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* 2004; 25(3):473-504.
13. Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25 Suppl 5(63-7).
14. Broadwell RD and Brightman MW. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J Comp Neurol* 1976; 166(3):257-283.
15. Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 1998; 21(6):1375-85.
16. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; 393(6680):72-6.
17. 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; 95(25):15043-8.
18. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1998; 1(4):271-2.
19. Joseph-Bravo P. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone neurons as transducers of energy homeostasis. *Endocrinology* 2004; 145(11):4813-5.
20. Sawchenko PE and Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 1983; 218(2):121-44.
21. Gottfried JA, O'Doherty J, Dolan RJ. Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. *Science* 2003; 301(5636):1104-7.
22. Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan XM, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE, Shen Z, Frazier EG, Yu H, Metzger JM, Kuca SJ, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Strack AM, MacIntyre DE, Van der Ploeg LH, Qian S. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(5):3240-3245.
23. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(1):322-327.
24. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92(4):573-585.
25. Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 1997; 12(4):229-241.

26. Elias CF, Saper CB, Maratos-Flier E, Tritos NA, Lee C, Kelly J, Tatro JB, Hoffman GE, Ollmann MM, Barsh GS, Sakurai T, Yanagisawa M, Elmquist JK. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *J Comp Neurol* 1998; 402(4):442-459.
27. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 1999; 20(1):68-100.
28. Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 1995; 15(3 Pt 2):2471-81.
29. Abbott CR, Rossi M, Wren AM, Murphy KG, Kennedy AR, Stanley SA, Zollner AN, Morgan DG, Morgan I, Ghatei MA, Small CJ, Bloom SR. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 2001; 142(8):3457-63.
30. Wortley KE, Chang GQ, Davydova Z, Fried SK, Leibowitz SF. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the arcuate nucleus stimulates lipid metabolism to control body fat accrual on a high-fat diet. *Regul Pept* 2004; 117(2):89-99.
31. Murphy KG. Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2005; 4(2):95-111.
32. Rogge G, Jones D, Hubert GW, Lin Y, Kuhar MJ. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9(10):747-58.
33. Vicentic A, Lakatos A, Jones D. The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 2006; 27(8):1934-1937.
34. Burns DL, Hausman SZ, Witvliet MH, Brennan MJ, Poolman JT, Manclark CR. Biochemical properties of pertussis toxin. *Tokai J Exp Clin Med* 1988; 13 Suppl(181-185).
35. Yermolaieva O, Chen J, Couceyro PR, Hoshi T. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001; 21(19):7474-7480.
36. Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall RA, Kuhar MJ. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett* 2005; 384(1-2):198-202.
37. Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan RM. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 2004; 999(2):181-192.
38. Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH, Jackson IM, Lechan RM. 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; 20(24):9224-34.
39. Dominguez G. The CART gene: structure and regulation. *Peptides* 2006; 27(8):1913-1918.
40. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997; 138(10):4489-4492.
41. Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 1988; 11(3):107-111.
42. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997; 46(12):2119-2123.

43. Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 1997; 138(11):5063-5066.
44. Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, Flier JS. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat Neurosci* 1998; 1(6):445-450.
45. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 1999; 22(2):221-232.
46. Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, Kristensen P. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 2000; 8(8):590-596.
47. Wierup N, Richards WG, Bannon AW, Kuhar MJ, Ahren B, Sundler F. CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul Pept* 2005; 129(1-3):203-211.
48. González L, Unikel C, Cruz C, Caballero A. Personalidad y Trastornos de la conducta alimentaria. *Salud mental* 2003; 26(3):1-8.
49. Hoek HW and van Hoeken D. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. *Int J Eat Disord* 2003; 34(4):383-396.
50. Rivera M, Parra M, Barriguete J. Trastornos de la conducta alimentaria como factor de riesgo para osteoporosis. *Salud Pública Mex* 2005; 47(308-318).
51. Mancilla-Diaz JM, Franco-Paredes K, Vazquez-Arevalo R, Lopez-Aguilar X, Alvarez-Rayon GL, Tellez-Giron MT. A two-stage epidemiologic study on prevalence of eating disorders in female university students in Mexico. *Eur Eat Disord Rev* 2007; 15(6):463-70.
52. Stoving RK, Hangaard J, Hansen-Nord M, Hagen C. A review of endocrine changes in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 1999; 33(2):139-52.
53. Grice DE, Halmi KA, Fichter MM, Strober M, Woodside DB, Treasure JT, Kaplan AS, Magistretti PJ, Goldman D, Bulik CM, Kaye WH, Berrettini WH. Evidence for a susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1. *Am J Hum Genet* 2002; 70(3):787-792.
54. Watts AG, Salter DS, Neuner CM. Neural network interactions and ingestive behavior control during anorexia. *Physiol Behav* 2007; 91(4):389-96.
55. Connan F, Campbell IC, Katzman M, Lightman SL, Treasure J. A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol Behav* 2003; 79(1):13-24.
56. Lawson EA and Klibanski A. Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008; 4(7):407-14.
57. Kaye WH, Bulik CM, Thornton L, Barbarich N, Masters K. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. *Am J Psychiatry* 2004; 161(12):2215-21.
58. American Psychiatric Association. DSM-IV. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4<sup>o</sup> ed. Washington, DC: 1994.
59. Krassas GE. Endocrine abnormalities in Anorexia Nervosa. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003; 1(1):46-54.
60. Heinrichs SC and Richard D. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 1999; 33(5):350-359.
61. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382(6588):250-252.
62. Grinspoon S, Gulick T, Askari H, Landt M, Lee K, Anderson E, Ma Z, Vignati L, Bowsher R, Herzog D, Klibanski A. Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(11):3861-3863.
63. Stoving RK, Hangaard J, Hagen C. Update on endocrine disturbances in anorexia nervosa. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001; 14(5):459-480.

64. Misra M, Miller KK, Bjornson J, Hackman A, Aggarwal A, Chung J, Ott M, Herzog DB, Johnson ML, Klibanski A. Alterations in growth hormone secretory dynamics in adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(12):5615-5623.
65. Lo SC, Ravaldi C, Cabras PL, Faravelli C, Ricca V. Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders. *Neuropsychobiology* 2008; 57(3):95-115.
66. De Groot LJ. Dangerous dogmas in medicine: the nonthyroidal illness syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(1):151-64.
67. 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; 53(2):366-77.
68. 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; 56(3):348-53.
69. van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, Bauer K, 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; 145(1):143-53.
70. van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol* 1996; 150(2):169-78.
71. Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E. Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid* 2008; 18(2):123-9.
72. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 1991; 129(5):2714-8.
73. 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; 34(2):259-72.
74. Lechan RM and Segerson TP. Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1989; 553(29-59).
75. Fekete C, Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM. Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol* 2004; 469(3):340-50.
76. 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; 307(4):531-8.
77. Merchenthaler I and 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(2-4):361-74.
78. Lechan R.M. Update on thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid Today* 1993; 16(1-11).
79. Ambach G, Palkovits M, Szentagothai J. Blood supply of the rat hypothalamus. IV. Retrochiasmatic area, median eminence, arcuate nucleus. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 1976; 24(1-2):93-119.

80. Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 37(4):705-710.
  81. Bowers CY. The role of cyclic AMP in the release of anterior pituitary hormones. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 185(263-90).
  82. Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T, Charli JL. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(2):231-47.
  83. O'Leary R and O'Connor B. Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 1995; 65(3):953-63.
  84. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80(4):1523-631.
  85. Yu R, Ashworth R, Hinkle PM. Receptors for thyrotropin-releasing hormone on rat lactotropes and thyrotropes. *Thyroid* 1998; 8(10):887-94.
  86. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001; 81(3):1097-142.
  87. Nikrodhanond AA, Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Hashimoto K, Liao XH, Refetoff S, Yamada M, Mori M, Wondisford FE. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem* 2006; 281(8):5000-7.
  88. Fekete C and Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol* 2007; 28(2-3):97-114.
  89. Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett* 2003; 543(1-3):5-10.
  90. Herwig A, Ross AW, Nilaweera KN, Morgan PJ, Barrett P. Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts* 2008; 1(2):71-79.
  91. Sive H. 'Model' or 'tool'? New definitions for translational research. *Dis Model Mech* 2011; 4(2):137-138.
  92. Lyons, D. M. *Animal Models*. Schatzberg, A. F. and Nemeroff, Ch. B. *Textbook of Psychopharmacology*. 4th edition. 2009. Virginia, American Psychiatric Publishing.
- Ref Type: Book Chapter
93. Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 134(4):319-329.
  94. Siegfried Z, Berry EM, Hao S, Avraham Y. Animal models in the investigation of anorexia. *Physiol Behav* 2003; 79(1):39-45.
  95. Watts AG. Dehydration-associated anorexia: development and rapid reversal. *Physiol Behav* 1999; 65(4-5):871-8.
  96. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 2004; 145(8):3754-3762.
  97. Watts AG. Neuropeptides and the integration of motor responses to dehydration. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24(357-84).
  98. Watts AG and Boyle CN. The functional architecture of dehydration-anorexia. *Physiol Behav* 2010; 100(5):472-477.
  99. 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; 19(14):6111-21.
  100. Álvarez Salas E. El papel de la desyodasa 2 en la regulación de las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas sometidas a anorexia por deshidratación. 2010.
  101. 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; 515(3):313-330.
102. 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; 47(5):384-388.
  103. 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; 159(1-3):54-60.
  104. Ishikawa K, Taniguchi Y, Kurosumi K, Suzuki M. Origin of septal thyrotropin-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 1986; 44(1):54-8.
  105. Prokai L. Central nervous system effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogues: opportunities and perspectives for drug discovery and development. *Prog Drug Res* 2002; 59(133-69).
  106. Vijayan E and McCann SM. Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 1977; 100(6):1727-30.
  107. Karydis I and Tolis G. Orexis, anorexia, and thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid* 1998; 8(10):947-50.
  108. Choi YH, Hartzell D, Azain MJ, Baile CA. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav* 2002; 77(1):1-4.
  109. García Luna CB. Identificación de factores involucrados en la expresión de la hormona liberadora de tirotrópina del núcleo paraventricular del hipotálamo en un modelo experimental de anorexia. 2009.
  110. OKAMOTO K and AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; 27(282-93).
  111. Redei E, Pare WP, Aird F, Kluczynski J. Strain differences in hypothalamic-pituitary-adrenal activity and stress ulcer. *Am J Physiol* 1994; 266(2 Pt 2):353-60.
  112. Will CC, Aird F, Redei EE. Selectively bred Wistar-Kyoto rats: an animal model of depression and hyper-responsiveness to antidepressants. *Mol Psychiatry* 2003; 8(11):925-32.
  113. Redei EE, Solberg LC, Kluczynski JM, Pare WP. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology* 2001; 24(6):632-9.
  114. Solberg LC, Olson SL, Turek FW, Redei E. Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281(3):R786-R794.
  115. Gomez F, Lahmame A, de Kloet ER, Armario A. Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology* 1996; 63(4):327-337.
  116. McAuley JD, Stewart AL, Webber ES, Cromwell HC, Servatius RJ, Pang KC. Wistar-Kyoto rats as an animal model of anxiety vulnerability: support for a hypervigilance hypothesis. *Behav Brain Res* 2009; 204(1):162-168.
  117. Paxinos G and Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th ed. USA: Elsevier, 2005.
  118. Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-159.
  119. Lechan RM and Kakucska I. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Ciba Found Symp* 1992; 168(144-158).

120. de Rijke CE, Hillebrand JJ, Verhagen LA, Roeling TA, Adan RA. Hypothalamic neuropeptide expression following chronic food restriction in sedentary and wheel-running rats. *J Mol Endocrinol* 2005; 35(2):381-390.
121. Wiersinga, WM. Nonthyroidal Illness. Wemen, SC, Ingbar, SH, Braverman, LE, and Utiger, RD. The thyroid. Ninth edition, 246-263. 2005. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Ref Type: Book Chapter

122. Watts AG. Understanding the neural control of ingestive behaviors: helping to separate cause from effect with dehydration-associated anorexia. *Horm Behav* 2000; 37(4):261-283.
123. Salter D and Watts AG. Differential suppression of hyperglycemic, feeding, and neuroendocrine responses in anorexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284(1):R174-R182.
124. 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; 109(6):1146-1157.
125. Kristensson E, Sundqvist M, Hakanson R, Lindstrom E. High gastrin cell activity and low ghrelin cell activity in high-anxiety Wistar Kyoto rats. *J Endocrinol* 2007; 193(2):245-250.
126. Lahmame A, Grigoriadis DE, De Souza EB, Armario A. Brain corticotropin-releasing factor immunoreactivity and receptors in five inbred rat strains: relationship to forced swimming behaviour. *Brain Res* 1997; 750(1-2):285-292.
127. Silva JE. The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann Intern Med* 2003; 139(3):205-213.
128. Cioffi F, Lanni A, Goglia F. Thyroid hormones, mitochondrial bioenergetics and lipid handling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17(5):402-407.
129. Boss O, Samec S, Paoloni-Giacobino A, Rossier C, Dulloo A, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 1997; 408(1):39-42.
130. Kristensson E, Sundqvist M, Astin M, Kjerling M, Mattsson H, Dornonville dIC, Hakanson R, Lindstrom E. Acute psychological stress raises plasma ghrelin in the rat. *Regul Pept* 2006; 134(2-3):114-117.
131. Dornonville dIC, Bjorkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Hakanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* 2001; 99(2-3):141-150.
132. Schepp W, Prinz C, Hakanson R, Schusdziarra V, Classen M. Bombesin-like peptides stimulate gastrin release from isolated rat G-cells. *Regul Pept* 1990; 28(3):241-253.
133. Moody TW, O'Donohue TL, Jacobowitz DM. Biochemical localization and characterization of bombesin-like peptides in discrete regions of rat brain. *Peptides* 1981; 2(1):75-79.
134. Hernanz A. Characterization and distribution of bombesin-like peptides in the rat brain and gastrointestinal tract. *Biochem Cell Biol* 1990; 68(9):1142-1145.
135. Costello JF, Brown MR, Gray TS. Bombesin immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus innervate the dorsal vagal complex in the rat. *Brain Res* 1991; 542(1):77-82.
136. Ladenheim EE, Behles RR, Bi S, Moran TH. Gastrin-releasing peptide messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is altered by melanocortin receptor stimulation and food deprivation. *Endocrinology* 2009; 150(2):672-678.

137. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998; 18(23):9996-10015.
138. Yamamoto Y, Ueta Y, Date Y, Nakazato M, Hara Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Matsukura S, Yamashita H. Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 65(1):14-22.
139. Taheri S, Sunter D, Dakin C, Moyes S, Seal L, Gardiner J, Rossi M, Ghatei M, Bloom S. Diurnal variation in orexin A immunoreactivity and prepro-orexin mRNA in the rat central nervous system. *Neurosci Lett* 2000; 279(2):109-112.
140. Misra M, Miller KK, Almazan C, Ramaswamy K, Lapcharoensap W, Worley M, Neubauer G, Herzog DB, Klibanski A. Alterations in cortisol secretory dynamics in adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10):4972-4980.
141. Putignano P, Dubini A, Toja P, Invitti C, Bonfanti S, Redaelli G, Zappulli D, Cavagnini F. Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women: comparison with plasma cortisol. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(2):165-171.
142. Gold PW, Gwirtsman H, Avgerinos PC, Nieman LK, Gallucci WT, Kaye W, Jimerson D, Ebert M, Rittmaster R, Loriaux DL. Abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal function in anorexia nervosa. Pathophysiologic mechanisms in underweight and weight-corrected patients. *N Engl J Med* 1986; 314(21):1335-1342.
143. Hotta M, Shibasaki T, Masuda A, Imaki T, Demura H, Ling N, Shizume K. The responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH) and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(2):319-324.
144. Woodward CJ, Hervey GR, Oakey RE, Whitaker EM. The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats. *Br J Nutr* 1991; 66(1):117-127.
145. Sebaai N, Lesage J, Vieau D, Alaoui A, Dupouy JP, Deloof S. Altered control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in adult male rats exposed perinatally to food deprivation and/or dehydration. *Neuroendocrinology* 2002; 76(4):243-253.
146. Makino S, Kaneda T, Nishiyama M, Asaba K, Hashimoto K. Lack of decrease in hypothalamic and hippocampal glucocorticoid receptor mRNA during starvation. *Neuroendocrinology* 2001; 74(2):120-128.
147. Timofeeva E, Picard F, Duclos M, Deshaies Y, Richard D. Neuronal activation and corticotropin-releasing hormone expression in the brain of obese (*fa/fa*) and lean (*fa/?*) Zucker rats in response to refeeding. *Eur J Neurosci* 2002; 15(6):1013-1029.
148. Yoshihara T, Honma S, Katsuno Y, Honma K. Dissociation of paraventricular NPY release and plasma corticosterone levels in rats under food deprivation. *Am J Physiol* 1996; 271(2 Pt 1):E239-E245.
149. Kakucska I, Qi Y, Lechan RM. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1995; 136(7):2795-2802.
150. Revollo JR and Cidlowski JA. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1179(167-178).
151. Dominguez G, Lakatos A, Kuhar MJ. Characterization of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide gene promoter and its activation by a cyclic AMP-dependent signaling pathway in GH3 cells. *J Neurochem* 2002; 80(5):885-893.
152. Aronsson M, Fuxe K, Dong Y, Agnati LF, Okret S, Gustafsson JA. Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(23):9331-9335.
153. Cintra A, Fuxe K, Harfstrand A, Agnati LF, Wikstrom AC, Okret S, Vale W, Gustafsson JA. Presence of glucocorticoid receptor immunoreactivity in corticotrophin releasing

- factor and in growth hormone releasing factor immunoreactive neurons of the rat di- and telencephalon. *Neurosci Lett* 1987; 77(1):25-30.
154. Elias CF, Lee CE, Kelly JF, Ahima RS, Kuhar M, Saper CB, Elmquist JK. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 2001; 432(1):1-19.
  155. Vicentic A, Hunter RG, Kuhar MJ. Effect of corticosterone on CART peptide levels in rat blood. *Peptides* 2005; 26(3):531-533.
  156. Savontaus E, Conwell IM, Wardlaw SL. Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res* 2002; 958(1):130-138.
  157. Vrang N, Larsen PJ, Tang-Christensen M, Larsen LK, Kristensen P. Hypothalamic cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) is regulated by glucocorticoids. *Brain Res* 2003; 965(1-2):45-50.
  158. Pearson KA, Stephen A, Beck SG, Valentino RJ. Identifying genes in monoamine nuclei that may determine stress vulnerability and depressive behavior in Wistar-Kyoto rats. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(11):2449-2461.
  159. Rittenhouse PA, Lopez-Rubalcava C, Stanwood GD, Lucki I. Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology* 2002; 27(3):303-318.
  160. Pare WP and Schimmel GT. Stress ulcer in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Behav* 1986; 36(4):699-705.
  161. Pare WP. Stress ulcer susceptibility and depression in Wistar Kyoto (WKY) rats. *Physiol Behav* 1989; 46(6):993-998.
  162. Pare WP. Learning behavior, escape behavior, and depression in an ulcer susceptible rat strain. *Integr Physiol Behav Sci* 1992; 27(2):130-141.
  163. Pare WP and Redei E. Sex differences and stress response of WKY rats. *Physiol Behav* 1993; 54(6):1179-1185.
  164. Pare WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats. *Physiol Behav* 1994; 55(3):433-439.
  165. Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983; 36(3):165-186.
  166. Broberger C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 1999; 848(1-2):101-113.
  167. Larsen PJ, Seier V, Fink-Jensen A, Holst JJ, Warberg J, Vrang N. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is present in hypothalamic neuroendocrine neurones and is released to the hypothalamic-pituitary portal circuit. *J Neuroendocrinol* 2003; 15(3):219-226.
  168. Shi ZX, Levy A, Lightman SL. The effect of dietary protein on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin gene expression. *Brain Res* 1993; 606(1):1-4.
  169. de Gortari P, Mendez M, Rodriguez-Keller I, Perez-Martinez L, Joseph-Bravob P. Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem Int* 2000; 37(5-6):483-496.
  170. Lechan RM and Fekete C. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. *J Endocrinol Invest* 2004; 27(6 Suppl):105-119.
  171. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in

- neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997; 138(6):2569-76.
172. Gardner DF, Kaplan MM, Stanley CA, Utiger RD. Effect of tri-iodothyronine replacement on the metabolic and pituitary responses to starvation. *N Engl J Med* 1979; 300(11):579-84.
  173. Brent GA and Hershman JM. Thyroxine therapy in patients with severe nonthyroidal illnesses and low serum thyroxine concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63(1):1-8.
  174. Denereaz N and 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; 136(4):1694-1700.
  175. Baratti-Elbaz C, Ghinea N, Lahuna O, Loosfelt H, Pichon C, Milgrom E. Internalization and recycling pathways of the thyrotropin receptor. *Mol Endocrinol* 1999; 13(10):1751-1765.
  176. Suzuki S, Solberg LC, Redei EE, Handa RJ. Prepro-thyrotropin releasing hormone 178-199 immunoreactivity is altered in the hypothalamus of the Wistar-Kyoto strain of rat. *Brain Res* 2001; 913(2):224-233.
  177. Refetoff S. Resistance to thyrotropin. *J Endocrinol Invest* 2003; 26(8):770-779.
  178. Baum AE, Solberg LC, Kopp P, Ahmadiyah N, Churchill G, Takahashi JS, Jameson JL, Redei EE. Quantitative trait loci associated with elevated thyroid-stimulating hormone in the Wistar-Kyoto rat. *Endocrinology* 2005; 146(2):870-878.
  179. 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; 23(1):38-89.
  180. Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, de Rijke YB, Kuiper GG, Uitterlinden AG, Visser TJ. Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6):2880-2888.
  181. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372(6505):425-432.
  182. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269(5223):540-543.
  183. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001; 411(6836):480-484.
  184. Sahu A and Kalra SP. Absence of increased neuropeptide Y neuronal activity before and during the luteinizing hormone (LH) surge may underlie the attenuated preovulatory LH surge in middle-aged rats. *Endocrinology* 1998; 139(2):696-702.
  185. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, . The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995; 377(6549):530-532.
  186. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D, Jr., Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 1996; 45(4):531-535.
  187. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999; 23(4):775-786.
  188. Hebebrand J, Blum WF, Barth N, Coners H, Englaro P, Juul A, Ziegler A, Warnke A, Rascher W, Remschmidt H. Leptin levels in patients with anorexia nervosa are reduced

- in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Mol Psychiatry* 1997; 2(4):330-334.
189. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 1999; 140(12):5995-5998.
  190. Jin L, Zhang S, Burguera BG, Couce ME, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 2000; 141(1):333-339.
  191. Sone M, Nagata H, Takekoshi S, Osamura RY. Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland. *Cell Tissue Res* 2001; 305(3):351-356.
  192. Knerr I, Schuster S, Nomikos P, Buchfelder M, Dotsch J, Schoof E, Fahlbusch R, Rascher W. Gene expression of adrenomedullin, leptin, their receptors and neuropeptide Y in hormone-secreting and non-functioning pituitary adenomas, meningiomas and malignant intracranial tumours in humans. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2001; 27(3):215-222.
  193. Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. *J Endocrinol* 2002; 174(1):121-125.
  194. Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis. *Neuroendocrinology* 2003; 78(6):321-330.
  195. Medina-Gomez G, Calvo RM, Obregon MJ. T3 and Triac inhibit leptin secretion and expression in brown and white rat adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1682(1-3):38-47.
  196. Paz-Filho G, Delibasi T, Erol HK, Wong ML, Licinio J. Congenital leptin deficiency and thyroid function. *Thyroid Res* 2009; 2(1):11-
  197. Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 1997; 46(7):1235-1238.
  198. De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 1995; 270(27):15958-15961.
  199. Murakami T, Iida M, Shima K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 214(3):1260-1267.
  200. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 1996; 271(10):5301-5304.
  201. Papaspyrou-Rao S, Schneider SH, Petersen RN, Fried SK. Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(5):1635-1637.
  202. Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 2000; 423(2):261-281.
  203. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem* 2000; 275(19):14563-14572.
  204. Swanson LW and Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 1980; 194(3):555-570.
  205. Emond M, Schwartz GJ, Ladenheim EE, Moran TH. Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 2):R1545-R1549.

206. Fekete C and Lechan RM. Neuroendocrine implications for the association between cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) and hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Peptides* 2006; 27(8):2012-8.
207. Sanchez E, Fekete C, Lechan RM, Joseph-Bravo P. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expression is differentially regulated in the hypothalamic paraventricular nucleus of lactating rats exposed to suckling or cold stimulation. *Brain Res* 2007; 1132(1):120-8.
208. van Dijk G, Evers S, Guidotti S, Thornton SN, Scheurink AJ, Nyakas C. The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. *Behav Brain Res* 2011;
209. Presse F and Nahon JL. Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat. *Neuroscience* 1993; 55(3):709-720.
210. Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 1999; 19(10):RC5-
211. O'Shea RD and Gundlach AL. NPY mRNA and peptide immunoreactivity in the arcuate nucleus are increased by osmotic stimuli: correlation with dehydration anorexia. *Peptides* 1995; 16(6):1117-1125.
212. Kelly AB and Watts AG. Mediation of dehydration-induced peptidergic gene expression in the rat lateral hypothalamic area by forebrain afferent projections. *J Comp Neurol* 1996; 370(2):231-246.
213. Watts AG and Sanchez-Watts G. Rapid and preferential activation of Fos protein in hypocretin/orexin neurons following the reversal of dehydration-anorexia. *J Comp Neurol* 2007; 502(5):768-782.
214. Lopez M, Seoane L, Tovar S, Senaris RM, Dieguez C. Thyroid status regulates CART but not AgRP mRNA levels in the rat hypothalamus. *Neuroreport* 2002; 13(14):1775-1779.
215. Puymirat J, Miehe M, Marchand R, Sarlieve L, Dussault JH. Immunocytochemical localization of thyroid hormone receptors in the adult rat brain. *Thyroid* 1991; 1(2):173-184.
216. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Baranowska-Bik A. Effects of cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) on hormone release. *Regul Pept* 2004; 122(2):55-59.
217. Naef L and Woodside B. Prolactin/Leptin interactions in the control of food intake in rats. *Endocrinology* 2007; 148(12):5977-5983.
218. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(13):7001-7005.
219. Rask-Andersen M, Olszewski PK, Levine AS, Schiøth HB. Molecular mechanisms underlying anorexia nervosa: focus on human gene association studies and systems controlling food intake. *Brain Res Rev* 2010; 62(2):147-164.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 27 de Junio del 2011, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Lic. Nut. Cinthia Berenice García Luna.

Dra. Patricia de Gortari Gallardo

---

Dr. Humberto Nicolini Sánchez

---

Dra. Erika Estrada Camarena

---

Dra. Elisa Azuara Liceaga

---

Coordinación de Certificación y Registro

**UACM**  
Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada Humano me es ajeno*



Cerro de Tlapacoyan 14 1er. Piso Col. Copilco  
Tels. 5658-8996, 5658-3079