

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

TÍTULO: “EFECTOS DEL HIPO- E HIPERTIROIDISMO SOBRE LA REGULACIÓN DE NEI EN ÁREAS ENCEFÁLICAS RELACIONADAS CON LA REPRODUCCIÓN”.

AUTOR: MÉDICA CAROLINA AYALA

CÓRDOBA

REPÚBLICA ARGENTINA

2013

Director de Tesis: Prof. Dra. María Ester Cobe

Co-Director de Tesis: Prof. Dra. Alicia I. Torres

MIEMBROS DE LA COMISIÓN DE TESIS

Prof. Dra. Graciela Stutz

Prof. Dra. Nelia Vermouth

Artículo 30° del reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía:

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS OPINIONES DE
ESTA TESIS”

El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Ciencias Fisiológicas de la Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas, Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina; en el Laboratorio de Reproducción y Lactancia del “Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo” (IMBECU-CONICET), CCT-CONICET, Mendoza, Argentina y en la Sección de Desarrollo Cerebral Perinatal (SPBD) del “Instituto de Histología y Embriología Dr. Mario Burgos” (IHEM-CONICET), Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina; de acuerdo a la reglamentación vigente de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, para optar por el Título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Durante la ejecución, la autora fue Becaria de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (01-08-2009 al 31-03-2011), Directora: Prof. Dra. María Ester Cobe y Doctoral tipo II de CONICET (01-04-2011 al 31-03-2013), Directora: Prof. Dra. María Ester Cobe, Co-Directora: Prof. Dra. Alicia M Seltzer. Asimismo se contó con el Apoyo financiero de subsidios de la Secretaría de Ciencia y Técnica (SECyT) de la Universidad Nacional de Córdoba, Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica Nacionales para la Promoción Científica y Tecnológica de Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT-ANPCyT) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme en este camino, acompañarme, escucharme y aconsejarme.

A mi Directora de Tesis por darme la oportunidad de hacer investigación, por apoyar las ideas e inquietudes que me fueron surgiendo a lo largo de estos años y que forman parte de esta tesis.

Al Dr. Jorge Pavan por apoyarme y darme sus sabios consejos en momentos difíciles.

A cada uno de los miembros de la Cátedra de Bacteriología y Virología Médicas en donde inicié mis primeros pasos, primero como estudiante y luego como becaria, por ayudarme siempre y recibirme con alegría y cariño cada vez que regreso.

A la Dra. Alicia M Seltzer por aceptarme en su laboratorio, haber sido mi Co-Directora en la beca Doctoral tipo II de CONICET y por sus consejos y conceptos sobre la importancia de ser científico de vocación.

A la Dra. Alicia I Torres, a la Dra. Graciela Stutz y a la Dra. Nelia Vermouth por sus consejos, correcciones y por haber apoyado cada paso que fuese necesario dar en estos años.

A los miembros del IMBECU:

- . *A la Dra. Susana R Valdez* por su apoyo incondicional, por haberme “adoptado”, por haber estado siempre en estos años, por ser una persona a la que admiro y considero una gran amiga.
- . *A la Dra. Marta Soaje* por ayudarme con sus consejos y su trabajo, por hacerme sentir que podía contar con ella.
- . *A la Lic. Gisela Pennacchio* por su predisposición, por ser una persona que no baja los brazos ante la adversidad y por su amistad.
- . *A la Técnica Norma Carreño* por sus mates en la mañana, por su alegría y por su gran ayuda al haber cuidado y tratado los animales que utilicé para mis experimentos.
- . *A la Dra. Graciela Jahn* por haberme recibido en su Instituto, en su grupo de trabajo y por su gran aporte y acompañamiento en el análisis estadístico de los resultados.
- . *A la Prof. Patricia Giudice* por recibirme siempre con alegría y colaborar cuando no podía acceder a alguna bibliografía.
- . *A la Dra. Mariella Superina y al Dr. Teodoro Stadler* por su calidez y su apoyo.

Al Lic. Francisco López-Aguilera por sus consejos y al Lic. Sergio Benitez por estar dispuesto a ayudarme con sus conocimientos.

A la Lic. Ivana Grasso por haber estado para ayudarme a superar cada momento difícil, a quien le debo mucho de lo que soy hoy y a quien siempre le estaré agradecida.

A mi amiga Cecilia Avanzi y a mi sobrina Milena por acompañarme siempre.

A mis compañeros del Grupo de Jóvenes Investigadores en Neurociencias de Cuyo (NeuroCuyo) por darme la posibilidad de hacer ciencia y difundirla y por saber entender cuando los tiempos eran escasos.

A la Dra. Gabriela Peirotti por escucharme y por sus consejos.

A mis amigas, un gran regalo de estos años: Liliana Altamirano, Analía Castro, Paula Ibañez, Gabriela Plateo Pignatari y Paola Sicilia, que son y serán parte de mi vida.

A mi familia adoptiva: especialmente a Mari y Nora que me incorporaron a sus vidas como si siempre hubiese sido parte de ella.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al CONICET por haberme otorgado las becas.

A la IBRO (International Brain Research Organization) y a la INF (International Neuroendocrine Federation) por permitirme participar de Congresos y entrenamientos internacionales que me hicieron crecer como profesional y como persona.

A mis compañeros del Instituto Mario Negri y a su Directora, Dra. María Grazia De Simoni.

A todos aquellos que no llegué a nombrar pero que fueron parte de mi vida durante los años del Doctorado.

ABREVIATURAS

Ac, anticuerpo	GPCR, receptores acoplados a proteína-G
ACh, acetilcolina	hipoT, grupo con inducción de hipotiroidismo
ACTH, hormona adrenocorticotropa	hiperT, grupo con inducción de hipertiroidismo
AgRP, péptido similar a la proteína Agouti	ICV, intracerebroventricular
α -MSH, hormona melanocito-estimulante	IHy, área incerto-hipotalámica
AM, horario entre las 10-12 hs	IPSCs, corrientes inhibitorias post-sinápticas
Arc, núcleo arcuato	-ir, inmunoreactividad
ARNm, mensajero del ácido ribonucleico	ITFs, factores de transcripción inducibles
ATP, adenosina-trifosfato	L-Dopa, dihidroxifenilalanina
AVPV, núcleo antero-ventroperiventricular	LH, hormona luteinizante
BNST, núcleo del lecho de la estría terminal	LHA, hipotálamo lateral o área hipotalámica lateral
CAE, comportamiento de aseo excesivo	LPO, área preóptica lateral
C-terminal, carboxilo terminal	L-T ₄ , L-tiroxina
cDNA, DNA complementario	MA, actividad motora
c-Fos, proteína c-Fos	MAPK, proteínas quinasas activadas por mitógenos
CoA, proteínas co-activadoras	MC4R, receptor tipo 4 de α -MSH
CoR, proteínas co-represoras	MCH, hormona melanocito-concentrante
DA, dopamina	MCH-R, receptor de MCH
D ₂ , segundo día del diestro	MCT8, monocarboxilato 8
DMH, núcleo dorsomedial hipotalámico	ME, eminencia media
DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético	MPA, área preóptica medial
E, día del estro	MPN, núcleo preóptico medial
EG, esteroides gonadales	NA, noradrenalina
Eje HHG, hipotálamo-hipófiso-gonadal	NEI, neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina-amida
Eje HHT, eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo	NGE, neuropéptido glicina-ácido glutámico
EPSCs, corrientes excitatorias post-sinápticas	NGS, suero normal de cabra
ER- α , receptor de estrógenos- α	NPY, neuropéptido Y
ER- β , receptor de estrógenos- β	OVLT, órgano vasculoso de la lámina terminal
E ₂ B, benzoato de estradiol	OVX, ovariectomizadas
FSH, hormona folículo-estimulante	P, día del proestro
GABA, ácido γ -amino-butírico	PCs, proconvertasas
GAD, descarboxilasa del ácido-glutámico	Pe, núcleo periventricular
GAD-67, descarboxilasa del ácido-glutámico-67	
GALP, péptido similar a la galanina	
GH, hormona del crecimiento	
GIRK, canales de K ⁺ activados por proteína G	
GnRH, hormona liberadora de gonadotrofinas	

PeFLH, región perifornical del hipotálamo lateral	TH, tirosina hidroxilasa
PeF, núcleo perifornical	THs, hormonas tiroideas
Pi, glándula pineal	TIDA, neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares
PM, horario entre las 17-19 hs	TRs, receptores de hormonas tiroideas
PLH, porción peduncular del hipotálamo lateral	TR α , receptor α de hormonas tiroideas
PLH ₍₁₎ , localización lateral del PLH	TR β , receptor β de hormonas tiroideas
PLH ₍₂₎ , localización medial del PLH	TR β ₁ , receptor β ₁ de hormonas tiroideas
PLHLatSubI, región lateral subincerta de la porción peduncular del hipotálamo lateral	TR β ₂ , receptor β ₂ de hormonas tiroideas
POA, área preóptica	TREs, elementos de respuesta a las THs
POMC, pro-opio-melanocortina	TRH, hormona liberadora de tirotropina
PP, neurohipófisis	TRH-Rs, receptores de TRH
p-MCH, pro-melanocito-concentrante	TRH-R1, receptor tipo 1 de tirotropina
pp-MCH, pre-pro-melanocito concentrante	TRH-R2, receptor tipo 2 de tirotropina
pp-TRH, pre-pro hormona liberadora de tirotropina	TSH, tirotropina
p-TRH, precursor de la hormona liberadora de tirotropina	TSH-R, receptor de tirotropina
PTU, 6-propil-2-tiouracilo	TTR, transtiretina o prealbúmina de unión a tiroxina
PVH, núcleo paraventricular hipotalámico	T ₃ , tri-iodotironina
RIA, radioinmunoanálisis o radioinmunoensayo	T ₄ , tiroxina
RXRs, receptores X del ácido retinoico	VMH, núcleo ventromedial hipotalámico
SC, vía subcutánea	VO, vía oral
SCN, núcleo supraquiasmático	VTA, área tegmental ventral
SHBG, globulina transportadora de esteroides sexuales	ZI, zona incerta
SNC, sistema nervioso central	ZIm, zona incerta medial
TGB, globulina de unión a tiroxina	ZIR, zona incerta rostral
	ZIV, zona incerta ventral
	3D, tridimensional
	3v, tercer ventrículo
	5-HT, serotonina

ÍNDICE

1. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. Primera Parte.....	2
1.1.1. Pro-hormonas: Generalidades.....	2
1.1.2. Pro-melanocito-concentrante.....	3
1.1.3. Neuropeptido ácido-glutámico-isoleucina-amida (NEI).....	4
1.1.3.1. Síntesis y localización anatómica.....	4
1.1.3.2. NEI induce el comportamiento de aseo excesivo, la actividad motora y la receptividad sexual en la rata.....	5
1.1.3.3. NEI y su función como neuromodulador.....	6
1.1.3.3.1. Estudios <i>in vivo</i>	6
1.1.3.3.2. Estudios <i>in vitro</i>	8
1.1.3.4. Características de las neuronas productoras de NEI.....	8
1.1.3.4.1. Regulación de las neuronas productoras de NEI localizadas en el hipotálamo lateral (LHA) (Fig. 5).....	8
1.2. Segunda Parte.....	11
1.2.1. El eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (eje HHT): Generalidades.....	11
1.2.1.1. Hormona liberadora de tirotropina (TRH): Síntesis, localización anatómica y regulación.....	11
1.2.1.2. Funciones de TRH.....	14
1.2.1.3. Tirotrofina (TSH).....	15
1.2.1.4. Hormonas tiroideas.....	15
1.2.1.5. Disfunción tiroidea: hipo- e hipertiroidismo.....	17
1.3. OBJETIVOS.....	21
1.4. HIPÓTESIS GENERAL.....	22
2. CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Animales y tratamiento.....	24
2.1.1. Experimento nº 1.....	24
2.1.2. Experimento nº 2.....	25
2.1.3. Experimento nº 3.....	26
2.2. Obtención de las muestras y procesamiento.....	26
2.2.1. Experimentos nº 1 y nº 2.....	26
2.2.2. Experimento nº 3.....	29
2.3. Métodos.....	30
2.3.1. Experimentos nº 1 y nº 2.....	30
2.3.1.1. Radioinmunoanálisis.....	30
2.3.1.1.1. Características del anticuerpo anti-NEI.....	30
2.3.1.1.2. Determinación de NEI.....	30

2.3.1.1.3. Determinaciones hormonales.....	31
2.3.2. Experimento nº 3.....	31
2.3.2.A. Experimento nº 3-A.....	31
2.3.2.A.1. Inmunohistoquímica (IHQ).....	31
2.3.2.A.1.1. Anticuerpo primario y puesta a punto de la IHQ.....	31
2.3.2.A.1.2. Selección de los cortes histológicos y protocolo de incubación.....	32
2.3.2.A.1.3. Digitalización de las imágenes.....	33
2.3.2.A.1.4. Cuantificación de las puntas y células NEI-ir.....	33
2.3.2.B. Experimento nº 3-B.....	33
2.3.2.B.1. Inmunofluorescencia (IF).....	33
2.3.2.B.1.1. Anticuerpos primarios y puesta a punto de la IF.....	33
2.3.2.B.1.2. Selección de los cortes histológicos y protocolo de incubación.....	33
2.3.2.B.1.3. IF doble de NEI y TH o de NEI y GAD-67.....	34
2.3.2.B.1.4. IF doble de NEI y TRH-R1.....	34
2.3.2.B.1.5. Captura de las imágenes.....	35
2.3.2.B.1.6. Procesamiento de las imágenes-software Image J.....	35
2.3.2.B.1.6.1. Densidad óptica (DO).....	35
2.3.2.B.1.6.2. Determinación de la relación NEI-TH y NEI-GAD-67.....	36
2.3.2.B.1.6.3. Determinación de la colocalización de NEI-GAD-67 y NEI-TRH-R1.....	37
2.4. Análisis estadístico.....	37
3. CAPÍTULO 3: RESULTADOS	38
3.1. EL HIPO- Y EL HIPERTIROIDISMO AFECTAN LA CONCENTRACIÓN DE NEI EN ÁREAS CEREBRALES DISCRETAS DE RATAS MACHO ADULTAS	39
Publicado: Ayala C, Valdez SR, Morero ML, Soaje M, Carreño NB, Sanchez MS, Bittencourt JC, Jahn GA, Celis ME. Hypo- and hyperthyroidism affect NEI concentration in discrete brain areas of adult male rats. <i>Peptides</i> . 32(6):1249-54, 2011.	
3.2. MODIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NEI SECUNDARIO A LA INDUCCIÓN DEL HIPO- E HIPERTIROIDISMO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA.....	44
3.3.A. EL HIPERTIROIDISMO AUMENTA LAS TERMINACIONES NERVIOSAS DEPENDIENTES DE NEI.....	56
3.3. B. EL HIPO- Y EL HIPERTIROIDISMO MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE NEI Y DE LA TH EN DISTINTAS ÁREAS HIPOTALÁMICAS DE RATAS MACHO ADULTAS	57
3.3.C. NEI COLOCALIZA CON EL TRH-R1 EN EL PLH _{LatSubi} Y EN LA PLH.....	69
4. CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	71
4.1. CONCLUSIONES	93
5. BIBLIOGRAFÍA	94

RESUMEN

El hipo- y el hipertiroidismo afectan el correcto funcionamiento del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (eje HHG) y del sistema nervioso central (SNC), el estudio de estas disfunciones en animales de experimentación ha permitido demostrar que las hormonas tiroideas (THs) pueden ser responsables de dichas alteraciones actuando en forma directa, o indirecta mediante la regulación a nivel central de moléculas neurotransmisoras y neuromoduladoras. El neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina-amida (NEI) actúa como neuromodulador en la liberación de la hormona luteinizante (LH) y como neurotransmisor en ciertos comportamientos como la actividad motora (MA) y el comportamiento de aseo excesivo (CAE). El presente trabajo de tesis fue realizado con la finalidad de estudiar la posible regulación de las THs sobre la expresión de NEI en distintas áreas hipotalámicas y de correlacionar las modificaciones de la misma con las manifestaciones clínicas que se producen en estas patologías. Para esto se desarrolló un modelo de hipo- en hipertiroidismo en ratas macho adultas y en hembras durante el ciclo estral en las que se estudiaron distintas regiones hipotalámicas involucradas en el control de la reproducción y del comportamiento. El análisis de las mismas fue realizado midiendo la concentración del péptido por radioinmunoanálisis y su expresión por estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. La relación de NEI con la expresión de enzimas como tirosina hidroxilasa (TH) y descarboxilasa del ácido-glutámico (GAD) y su posible modificación secundaria a la disfunción tiroidea también fue estudiada. Para determinar si la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) podría ejercer algún efecto regulatorio sobre la neurona de NEI, se determinó la presencia de su receptor 1 (TRH-R1) en los somas que expresan el péptido. Los resultados obtenidos demuestran que tanto el déficit como el exceso de THs son capaces de modificar la concentración del péptido en distintas áreas hipotalámicas y que posiblemente los cambios en la concentración de NEI sean mediados en forma directa por las THs, o indirecta a través de los esteroides gonadales o de TRH actuando a través del TRH-R1. También se demostró que existe una interrelación entre NEI y los somas y fibras que expresan TH, modificándose la misma cuando los animales son expuestos a exceso de THs. Por lo tanto, estos resultados demuestran que NEI podría estar involucrado en los mecanismos subyacentes a las alteraciones a nivel reproductivo y del comportamiento observadas en estas patologías.

SUMMARY

Hypo- and hyperthyroidism affect the proper functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG axis) and the central nervous system (CNS), studies done in experimental animals have demonstrated that in the CNS thyroid hormones (THs) are responsible of these changes acting directly or indirectly through the modulation of neurotransmitters and neuromodulators. The neuropeptide glutamic-acid-isoleucine-amide (NEI) acts as a neuromodulator in the release of luteinizing hormone (LH) and as a neurotransmitter in certain motivated behaviors as motor activity (MA) and excessive grooming behavior (EGB). This thesis work was performed in order to study the possible regulation of TSH on NEI expression in various hypothalamic areas and to correlate that changes with the clinical manifestations that occur in these pathologies at the reproductive and central levels. For this aim a rat model of hypo- and hyperthyroidism was developed in adult male and females during the estrous cycle. A series of hypothalamic regions involved in the control of reproduction and motivated behaviors were studied. NEI was determined by radioimmunoassay, immunohistochemistry and immunofluorescence methods. The relation of NEI with other molecules such as tyrosine hydroxylase (TH) and glutamic-acid-decarboxylase (GAD) and its possible modification secondary to the changes on thyroid hormones levels was studied. To determine a possible regulatory mechanism between thyrotropin releasing hormone (TRH) on NEI neuron, the presence of its receptor 1 (TRH-R1) was determined in NEI cells. The results demonstrate that both high and low levels of THs are able to modify the concentration of the peptide in various hypothalamic areas probably directly or indirectly through gonadal steroids or by TRH. Also it was demonstrated that there is an interrelation between NEI and the soma and fibers expressing TH which changed in the hyperthyroid model. In summary, these results show that NEI could be involved in the mechanisms underlying the impairments at the reproductive and behavioral levels observed in these pathologies.

CAPÍTULO 1
INTRODUCCIÓN GENERAL

El sistema nervioso y el sistema endócrino se encuentran íntimamente relacionados estableciendo mecanismos de regulación mutua. Pese a las diferencias funcionales y estructurales entre éstos, ambos actúan a través de un mecanismo similar: liberación de intermediarios químicos y moléculas mensajeras (neurotransmisores y hormonas respectivamente) que alcanzan la célula efectora desencadenando una respuesta determinada (1). Según el Dr. Clark T. Sawin, una hormona presenta los siguientes requisitos: *"Secretada por células vivas en cantidades muy pequeñas dentro del organismo; transportada usualmente por la sangre a puntos específicos de acción donde no son usadas como fuente energética, regulando pero sin iniciar reacciones y desencadenando respuestas apropiadas del organismo"*, si bien esta definición presenta limitaciones, permite dar un marco al concepto de hormona (2). Con el desarrollo del radioinmunoensayo a mediados del siglo pasado, por los Dres. Berson S y Yalow R, basado en la competencia entre la hormona radioactiva y la natural por puntos específicos de un anticuerpo (Ac) de alta afinidad, se pudieron detectar hormonas en concentraciones de nanogramos o picogramos en sangre y otros líquidos corporales, contribuyendo esta técnica al descubrimiento de la primera hormona hipotalámica con función reguladora sobre la adenohipósis, la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), probando con éste y otros estudios la teoría del control neurohumoral de la adenohipófisis (2-5). A través de la producción de factores liberadores hipotalámicos, el sistema nervioso central (SNC) ejerce una importante influencia regulatoria sobre la secreción de las hormonas hipofisarias (6), estableciéndose entre el SNC y el endócrino mecanismos de retroalimentación positiva y negativa que permiten establecer un estado de homeostasis neuroendocrina.

1.1. Primera Parte

1.1.1. Pro-hormonas: Generalidades

Las pre-pro-hormonas son proteínas de alto peso molecular que poseen en su extremo N-terminal un péptido señal que permite que la molécula sea direccionada a un lugar específico de la célula, cumplida su función este péptido se escinde. Luego de una serie de mecanismos pos-traduccionales, las pro-hormonas dan lugar a múltiples péptidos biológicamente activos. Uno de estos mecanismos es llevado a cabo por la acción de endoproteasas, proconvertasas (PCs), que clivan a la molécula en pares de aminoácidos básicos (Lys-Arg, Arg-Arg, Lys-Lys) de su extremo carboxilo (C)-terminal (7). Múltiples moléculas presentan estas características, entre ellas podemos citar a la pro-opio-melanocortina (POMC) que en la adenohipófisis da origen a la hormona adrenocorticotrofa (ACTH) y péptidos semejantes de β -endorfina, mientras que en el lóbulo hipofisario intermedio da lugar a la hormona melanocito-estimulante (α -MSH) (8);

otra, es el precursor de la hormona liberadora de tirotrófina (p-TRH) que origina a la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) y formas intermedias (9, 10). La hormona pro-melanocito-concentrante (p-MCH) presenta las mismas características descriptas, las cuales serán detalladas en la sección 1.1.2.

1.1.2. Pro-melanocito-concentrante

La pre-pro-melanocito concentrante (pp-MCH) es una molécula compuesta por 165 aminoácidos. El DNA complementario (cDNA) que codifica para pp-MCH se encuentra altamente conservado en la rata, el humano y el ratón con un 80 a 90% de homología en su secuencia (**Fig. 1**).

Secuencia de aminoácidos que componen pp-MCH	
A. En humanos	1 makmnlssyi liltfslfsq gillsasksi rnl ddd mvfn tfrlgk g fqk edtae k svia 61 psle g yknde ss fm nee enk vskntgsk h n flnhglplnl aik g yqalkg svd fpaengv 121 qntestqekr eigdeensak fpigrrdfdm lr c mlgrvyr pcwqv
B. En ratas	1 makm l ssym lml a fslfsh gillsasksi rn ve ddivfn tfrmgk a fqk edtae r svva 61 psle g yknde sg fm k ddddk tt kntgsk q n lv t hglplsl av k pylalkg pav fpaengv 121 qntestqekr eigdeensak fpigrrdfdm lr c mlgrvyr pcwqv

Fig. 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos que componen pp-MCH en humanos y ratas. A. Corresponde a la secuencia en humanos: melanin-concentrating-hormone [*Homo sapiens*] GenBank: AAA63214.1; **B. En ratas:** melanin-concentrating-hormone precursor [*Rattus norvegicus*] GenBank: AAA41580.1. Marcados con rojo los aminoácidos que difieren entre las especies.

Por la acción de endopeptidasas en el aa Gly21 se genera p-MCH (144 aa) (11). El clivaje selectivo de p-MCH en pares de aminoácidos básicos de su extremo C-terminal es llevado a cabo por las PCs 1/3 y 2, que procesan precursores cuyos productos finales son almacenados en gránulos secretorios neuroendócrinos (12).

De p-MCH derivan 3 péptidos, la hormona melanocito-concentrante (MCH), el neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina-amida (NEI) y el neuropéptido glicina-ácido-glutámico (NGE) (13, 14). Tanto PC1/3 como PC2 son capaces de clivar el sitio Arg145-Arg146 dando lugar a MCH, mientras que sólo PC2 es la responsable del clivaje en los aa Lys129-Arg130, siendo la enzima clave para la producción de NEI (**Fig. 2**). La importancia de PC2 en el clivaje de NEI ha sido demostrada en ratones mutantes con producción de PC2 truncada e inactiva, en los que se observó una marcada disminución en el contenido de NEI y un efecto opuesto en el de MCH (7). Otro mecanismo pos-traduccional

involucrado en el procesamiento de p-MCH es llevado a cabo por la carboxipeptidasa E, que es una enzima especializada en el clivaje de los residuos básicos del extremo C-terminal de los péptidos derivados de las pro-hormonas. Se ha demostrado que la ausencia de esta enzima en ratones obesos (*fat/fat*) disminuye hasta 10 veces el contenido de NEI en extractos hipotalámicos, mientras que no se modifica la concentración de MCH. Por lo tanto, son dos los mecanismos limitantes en la producción de NEI maduro (15).

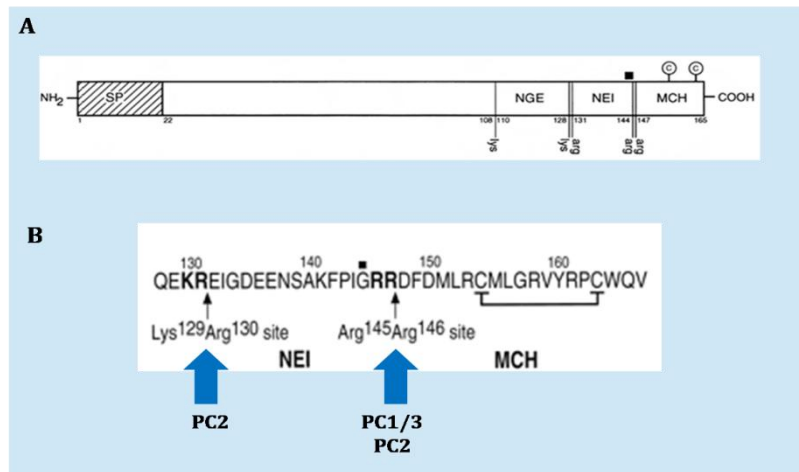


Fig. 2. Representación esquemática del clivaje de la pre-pro-melanocito concentrante (pp-MCH) en los sitios específicos que dan lugar a NEI, MCH y NGE. A. Representación de la molécula completa de pp-MCH; **B.** secuencia de aminoácidos que componen NEI y MCH. Las flechas indican los sitios donde PC2 escinde p-MCH para dar lugar al péptido NEI, ■ representa el sitio amidado. Esquema modificado a partir de Viale A et al. 1999 y Bittencourt JC et al. 1992 (7, 16).

Estudios realizados en roedores (16–18) y en humanos (14, 19), demuestran que a nivel del SNC la pp-MCH se sintetiza principalmente en el diencefalo. Es importante destacar que MCH ha sido la más estudiada, sobre todo en relación a la obesidad, el control de la ingesta y el ritmo circadiano (20, 21). El péptido NGE ha sido el menos estudiado de los tres, se ha demostrado que induce el aumento de los neurofilamentos de actina y la producción de sinaptofisina en el día 18 del desarrollo fetal en la rata (13, 22).

1.1.3. Neuropeptido ácido-glutámico-isoleucina-amida (NEI)

1.1.3.1. Síntesis y localización anatómica

NEI es un péptido lineal de 13 aa que surge del clivaje de p-MCH (13, 14, 22). La presencia de un residuo *Gly* en su extremo C-terminal sugiere fuertemente que este péptido se encuentra amidado (22, 23). La inmunoreactividad (-ir) de MCH y NEI y la expresión del mensajero del ácido ribonucleico (ARNm) de p-MCH se observa principalmente en regiones diencefálicas tales como el área incerto-hipotalámica (IH_y) (**Fig. 3A**)(16, 18, 24) y la región perifornical (PeFLH) y la porción peduncular (PLH) del

hipotálamo lateral (LHA) (**Fig. 3B**), observándose proyecciones de estas neuronas hacia todo el SNC (14, 16, 17, 25–27); incluso a la neurohipófisis (PP) donde las fibras NEI-ir se presentan preferentemente concentradas hacia la periferia de la glándula (16), sugiriendo su relación con los terminales que contienen ocitocina (28). La distribución anatómica de las neuronas y fibras que expresan NEI a nivel hipotalámico, se correlaciona con la demostrada para los receptores de estrógenos y andrógenos (29).

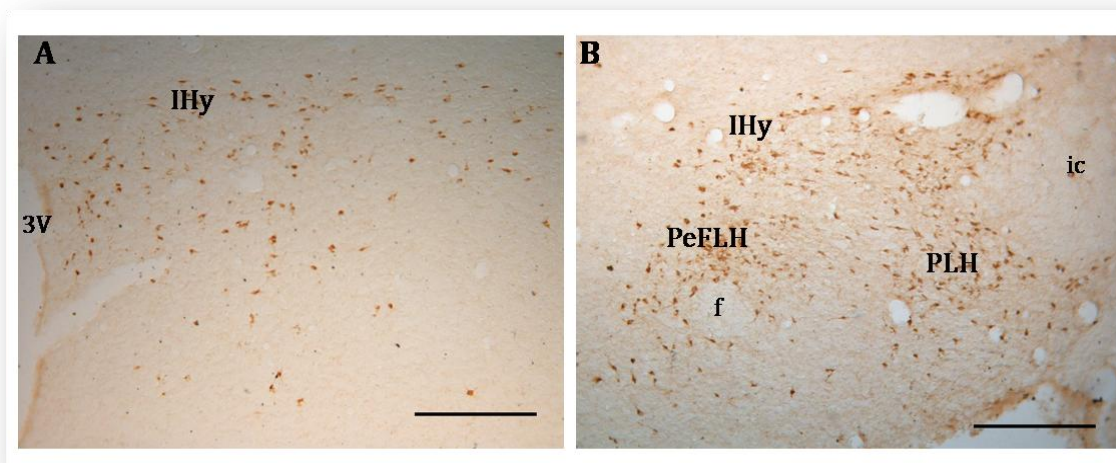


Fig. 3. Distribución diencefálica de las células NEI-ir. A. Área incerto hipotalámica (IHy) a aproximadamente -2.28 mm de distancia al Bregma, **B.** porción peduncular del hipotálamo lateral (PLH) y región perifornical del hipotálamo lateral (PeFLH) aproximadamente a -2.76 mm de distancia al Bregma; 3v, tercer ventrículo; f, fórnix; ic, cápsula interna. Fotomicrografía de luz de inmunohistoquímica revelada con diaminobenzidina. Barra de Escala: 100 µm.

1.1.3.2. NEI induce el comportamiento de aseo excesivo, la actividad motora y la receptividad sexual en la rata

Estudios *in vivo* han demostrado que NEI presenta funciones neurotransmisoras y neuromoduladoras. Como neurotransmisor induce el comportamiento de aseo excesivo (CAE) y la actividad motora (MA) (30), la inyección del péptido en el área tegmental ventral (VTA) produce aumento del CAE y de la MA a los 30 y 60 min respectivamente, correlacionándose con un incremento en los niveles de noradrenalina (NA) en el núcleo accumbens y aumento en la relación del metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y dopamina (DA) (DOPAC/DA) en el núcleo caudado. Por lo tanto, NEI induce cambios en el metabolismo de las catecolaminas posiblemente favoreciendo su liberación en el núcleo accumbens y en el complejo caudado-putamen mediando de esta manera su acción en estos comportamientos (31). En otro trabajo se demostró que el CAE inducido por NEI involucra la acción de NA a través del receptor β_1 -adrenérgico (32). Las

implicancias del sistema colinérgico en relación a la inducción del CAE y la MA mediada por NEI también han sido estudiados; la inyección de atropina (antagonista muscarínico) administrada intra-cerebroventricular (ICV) 5 min antes de la inyección de NEI suprime el efecto del péptido sobre el CAE y la MA, sin embargo, la inyección de dihidro- β -eritroidina (antagonista nicotínico) previo a la administración de NEI no produce cambios. Por lo tanto, el sistema colinérgico estaría involucrado en estos efectos a través de la activación de los receptores muscarínicos (33), principalmente del receptor μ_1 (34). En la rata hembra adulta la inyección bilateral del péptido en el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) estimula el comportamiento exploratorio, mientras que su inyección en el MPA induce un aumento en la receptividad sexual (35).

1.1.3.3. NEI y su función como neuromodulador

1.1.3.3.1. Estudios *in vivo*

Viale A *et al.* demostraron que NEI y MCH tienen una función importante en la regulación central del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (eje HHG) mediante la determinación de la expresión del ARNm de MCH y de NEI y los efectos del benzoato de estradiol (E₂B) sobre la síntesis y la liberación de NEI en relación al pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) en monas ovariectomizadas (OVX) (36). La expresión génica de la p-MCH se encontró predominantemente en el hipotálamo (36) tal como había sido demostrado previamente en la rata (16). La exposición de las monas OVX a E₂B provoca variaciones fásicas y paralelas en la inmunoreactividad de ambos péptidos observándose un aumento transitorio de su expresión a las 30 h pos-tratamiento, coincidente con el pico del estradiol; luego disminuye y aumenta nuevamente a las 72 h coincidiendo con el pico de la LH. Estos resultados sugieren la participación de estos péptidos en la regulación preovulatoria del ciclo reproductivo en los primates (36). La inyección bilateral de MCH en el área preóptica lateral o medial (LPO y MPA respectivamente) de ratas OVX tratadas con E₂B induce la liberación de la LH (37). En el año 2004 Attademo AM *et al.* demostraron que la inyección ICV de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de NEI en ratas macho y en ratas hembra OVX tratadas con 10 μg E₂B + 40 μg de progesterona aumenta los niveles de LH en suero comparado con los animales controles, a los que se les inyectó fluido cerebro-espinal artificial (38). En el año 2006 Attademo AM *et al.* publicaron un trabajo donde se describe el sustrato anatómico por el que NEI induciría la liberación de la LH en ratas de la cepa Wistar, OVX y en ciclo, distribuidas en los siguientes grupos: 1-OVX perfundidas 15 días posterior a la cirugía; 2-OVX + 10 μg de E₂B y perfundidas 48 h después; 3- OVX + 10 μg de E₂B + 40 μg de progesterona inyectada 48 h posterior al E₂B y perfundidas 5 horas después; 4- OVX + aceite de sésamo; 5- hembras en ciclo perfundidas el día del proestro (P); 6- hembras en

ciclo perfundidas el día del diestro. Los resultados muestran neuronas NEI-ir en la zona incerta medial (ZIm), en el perifornix (PeF) y en el LHA observándose estrecha relación con los somas TH-ir en la ZIm. En cuanto a la distribución de las fibras que expresan NEI se describe su presencia en el núcleo medioseptal, en la banda diagonal de Brocca, en los alrededores del órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLt), en el área preóptica (POA) y en la lámina interna de la eminencia media (ME). También en este trabajo se analiza la distribución de las fibras NEI-ir en relación a los somas neuronales que expresan la proteína c-Fos en la tarde del P en el MPA y en el núcleo antero-ventroperiventricular (AVPV)(39); c-Fos es una proteína codificada por el gen c-fos y corresponde a uno de los factores de transcripción inducibles (ITFs). Este factor luego de su activación llevada a cabo por diversos estímulos extracelulares interactúa con el DNA para influenciar la transcripción de genes específicos, como por ejemplo el de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), indicando la activación de dicha célula (40). Además se estudió la relación de las terminales que expresan NEI con las GnRH-ir y con los vasos del sistema porta-hipofisario en la ME demostrándose una relación estrecha con ambos. En la tarde del P y en las hembras OVX + E₂B + progesterona se demuestra que en las neuronas localizadas en el AVPV que expresan GnRH + c-Fos, observadas en este trabajo (39) y en otros (40), aproximadamente un 10% reciben fibras que expresan NEI; se describe además una intensa distribución de las terminales NEI-ir en el OVLt y en el POA con inervación de aproximadamente el 60% de las neuronas que expresan GnRH-c-Fos. Como conclusión, NEI podría inducir la liberación de la LH en forma directa a través de su liberación desde la ME en los vasos del sistema porta-hipofisario o en forma indirecta modulando la acción de las neuronas que expresan la GnRH en el MPA y en el AVPV y/o por modulación de las terminales de GnRH localizadas en la ME. La presencia de los somas NEI-ir junto con los que expresan TH en la ZIm podría indicar otro posible mecanismo de regulación del pico de la LH (**Fig. 4**) (39).

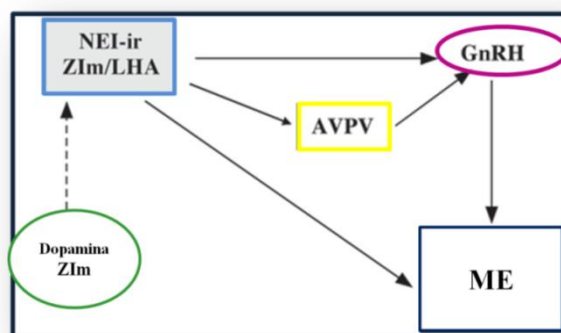


Fig. 4. Representación esquemática de las distintas vías postuladas por las que NEI podría inducir o modular la liberación de LH. Modificado a partir de Attademo AM et al. 2006 (39).

1.1.3.3.2. Estudios *in vitro*

Estudios realizados en explantes hipotalámicos demostraron que la MCH induce la liberación de la GnRH y en consecuencia de la LH. MCH realiza estas acciones a través de sus receptores 1 y 5 (MCH-R1 y MCH-R5, respectivamente) (37). En otro trabajo se utilizaron cultivos de células hipofisarias de ratas hembra para demostrar si NEI podría actuar directamente sobre estas células e inducir la liberación de la LH y/o potenciar la acción de la GnRH y se estudió además el posible efecto del péptido sobre la liberación de otras hormonas hipofisarias tales como prolactina, hormona del crecimiento (GH) y la hormona folículo-estimulante (FSH). Los resultados demostraron que NEI induce una liberación rápida de la LH y que ésta es dosis dependiente, observándose la máxima respuesta a las 4 h luego de aplicado el estímulo con un aumento en los valores de la LH cinco veces mayores a los hallados en el control y se evidenció un efecto potenciado cuando se adicionó en forma conjunta con la GnRH. NEI no fue capaz de liberar prolactina, GH o FSH, confirmando su especificidad sobre la LH. A nivel ultraestructural se demostró que NEI induce cambios en la morfología de las células luteotrofas con un marcado desarrollo del retículo endoplásmico, del complejo de Golgi y un aumento del número de gránulos secretorios próximos a la membrana celular. Las células somatotrofas, lactotrofas y tirotrofas no presentaron cambios después del tratamiento con NEI (41).

1.1.3.4. Características de las neuronas productoras de NEI

Se ha demostrado que casi la totalidad ($96 \pm 3\%$) de las neuronas del IHy (antes llamada ZIm) y del LHA que expresan NEI también expresan MCH (16). Estas somas han sido estudiados principalmente en relación al control de la ingesta y si bien ha sido demostrado que NEI no ejerce ningún efecto regulatorio sobre la alimentación (42, 43), el análisis de las características de los mismos nos permiten inferir los mecanismos regulatorios que pueden actuar sobre la síntesis, liberación y degradación de NEI.

1.1.3.4.1. Regulación de las neuronas productoras de NEI localizadas en el hipotálamo lateral (LHA) (Fig. 5)

Las células responsables de la síntesis de NEI presentan un ritmo, aparentan estar inactivas durante la vigilia y el período del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR, o REM en inglés), mientras que son activadas por la glucosa, el frío y durante el sueño profundo (44). Las concentraciones fisiológicas de la glucosa a nivel del SNC varían entre 0.2 a 5 mM (en condiciones de hipoglucemia e hiperglucemia sistémica, respectivamente). La disminución de la concentración de la glucosa induce la despolarización de esta célula con un aumento en la resistencia de membrana de la misma, con una media-máxima del

efecto a concentraciones de glucosa de 0.8 mM. La resistencia de la membrana es mayor a niveles de glucosa de 5 mM, observándose un incremento del $74 \pm 18 \%$ en la misma célula comparado a lo observado a 0.2 mM. Por lo tanto, las concentraciones fisiológicas de la glucosa aumentan la excitabilidad eléctrica de las neuronas que sintetizan MCH/NEI, causando su despolarización y aumento de la resistencia de la membrana plasmática. Este mecanismo sería llevado a cabo por el ingreso de la glucosa a la célula, su metabolización y la producción de adenosina-trifosfato (ATP) seguido del cierre de los canales de potasio sensibles a ATP localizados en la membrana plasmática, suprimiendo la conductancia iónica inhibitoria de estas células. Las neuronas de MCH/NEI proyectan hacia áreas relacionadas con el control del apetito, el metabolismo y el ciclo vigilia-sueño. Las acciones excitatorias de la glucosa promoverían el sueño y la conservación de la energía cuando estos recursos se encuentran altos, por ej. luego de alimentarse y a la inversa la disminución de la concentración de la misma suprimiría el sueño y promovería la actividad y la búsqueda de alimento (45).

Estos somas reciben terminales excitatorias e inhibitorias, el glutamato una vez unido a sus receptores ejerce un efecto despolarizante, mientras que el ácido γ -amino-butírico (GABA) induce su hiperpolarización (46). También expresan MCH-R1 lo que evidencia un posible mecanismo autoregulatorio de retroalimentación negativa a través de la inhibición de los canales de calcio dependientes de voltaje (47). Por otro lado, orexina ejerce acciones excitatorias directas induciendo la despolarización de la membrana plasmática o indirectas a través del aumento de la liberación de glutamato (48). También reciben terminales del neuropéptido Y (NPY) y de la α -MSH, ambos provenientes del núcleo arcuato (Arc); NPY tiene un efecto estimulador (49) mientras que α -MSH la inhibe actuando en forma directa a través de su receptor tipo 4 (MC4R) (50) o en forma indirecta a través de las neuronas del núcleo dorsomedial (DMH) y paraventricular hipotalámico (PVH) (51).

Se ha demostrado que durante el período de vigilia, la NA, la acetilcolina (ACh) y la serotonina (5-HT) inhiben las neuronas de MCH/NEI: la NA actúa a través del receptor adrenérgico- α_2 estimulando canales de K^+ activados por proteína-G (GIRK) y modula los inputs sinápticos disminuyendo la frecuencia de las corrientes excitatorias pos-sinápticas (EPSCs) e incrementando las inhibitorias (IPSCs); la ACh induce un efecto hiperpolarizante a través de los receptores muscarínicos (48) e incrementa la liberación de GABA por la activación de receptores nicotínicos que contienen la subunidad α -7 (52) y la serotonina induce hiperpolarización de la membrana de estas neuronas (48). El efecto opuesto se observa durante el período de sueño profundo (46).

Respecto a la DA, actúa a través del receptor adrenérgico- α_2 estimulando los canales GIRK, la activación de éstos ejerce un efecto hiperpolarizante, disminuyendo la excitabilidad de estas neuronas. Además, estas somas reciben mayormente inputs GABAérgicos y menos glutamatérgicos; la DA modula estos inputs de una manera compleja: a bajas concentraciones activa al receptor dopaminérgico (D) 1, promoviendo la actividad presináptica, mientras que a altas concentraciones, inhibe la actividad presináptica a través del D2. Por lo tanto la acción de la DA llevaría a una disminución en la excitabilidad de la neurona de MCH, disminuyendo la liberación de MCH y el comportamiento alimenticio (53).

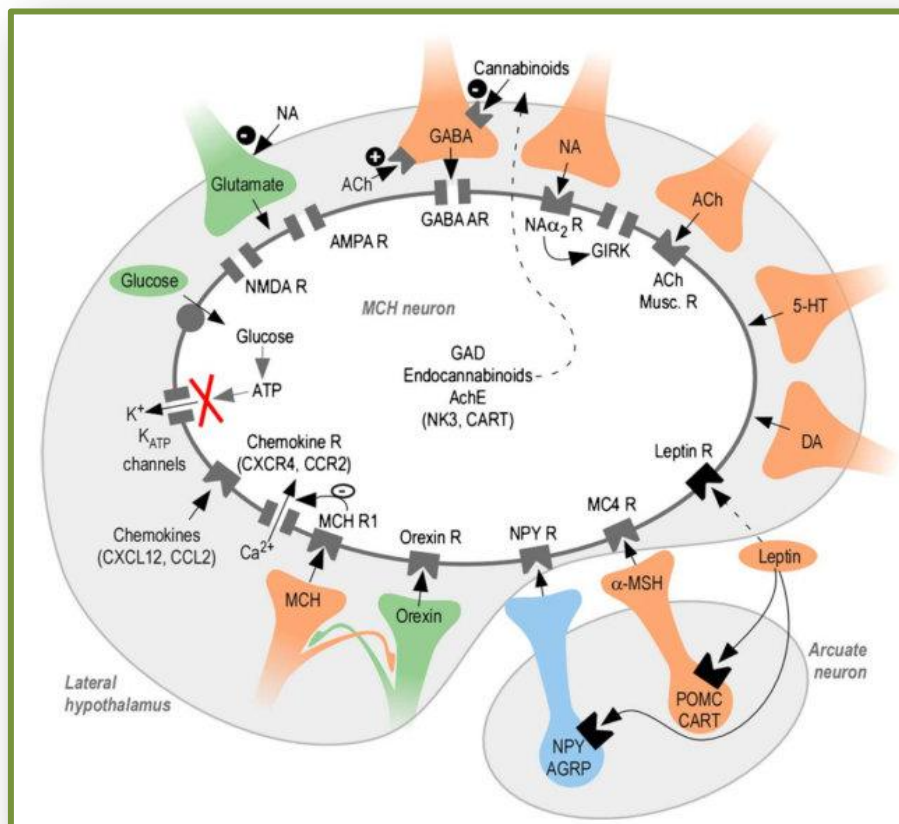


Fig. 5. Esquema de la regulación de la neurona de pp-MCH en el hipotálamo lateral (LHA). La regulación de la neurona productora de NEI ha sido muy estudiada en relación a los mecanismos de MCH involucrados en control de la ingesta y el ciclo vigilia/sueño. Distintas moléculas ejercen acciones inhibitorias (marcadas con naranja) o excitatorias (marcadas en verde). En azul se encuentra el input de NPY ya que aún no está definido su efecto. Tomado de Guyon A et al. 2009 (46).

1.2. Segunda Parte

1.2.1. El eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (eje HHT): Generalidades

La TRH es sintetizada por las neuronas del PVH y alcanza la adenohipófisis a través de su liberación en la ME y los vasos del sistema porta-hipofisario. En la adenohipófisis actúa sobre las células tirotrofas estimulando la síntesis y la secreción de la tirotrofina (TSH). La TSH actúa sobre la glándula tiroides, siendo el factor más importante en la estimulación de la síntesis y la secreción de las hormonas tiroideas (THs) (54–58). Las THs se distribuyen por sangre a los diferentes órganos y tejidos, regulando el metabolismo basal e interviniendo en procesos tales como, el crecimiento celular, la regulación de la temperatura corporal, el nivel de colesterol, el humor, la memoria y la capacidad de concentración, entre otros. Tiroxina (T_4) y tri-iodotironina (T_3) ejercen a nivel hipotalámico e hipofisario un efecto inhibitorio sobre la síntesis y la liberación de la TRH y de la TSH respectivamente (59). Por lo tanto, el eutiroidismo es mantenido como resultado de un balance entre la retroalimentación positiva que ejerce la TRH sobre la TSH y el control negativo que ejercen las THs sobre la expresión de la TRH y la liberación de la TSH (60–62) (**Fig. 6**).

Son escasos los conocimientos en relación a los efectos de NEI sobre este eje, un trabajo publicado en el año 2000 demostró que NEI es capaz de inhibir la liberación de la TRH cuando es agregado en explantes hipotalámicos (63).

1.2.1.1. Hormona liberadora de tirotrofina (TRH): Síntesis, localización anatómica y regulación

La TRH es un tripéptido que se sintetiza a partir de un precursor inactivo (pp-TRH) de 26 kDa (255 aminoácidos en la rata) que experimenta una serie de modificaciones post-traduccionales mientras es transportado a través de su vía secretoria (59, 64, 65). Este procesamiento es llevado a cabo por las PCs, principalmente por la PC 1/3 y secundariamente por la PC2. El precursor inmediato de la TRH es la TRH-Gly que luego es amidado dando lugar a la TRH (pGln-His-Pro-NH₂) (66–68).

Las neuronas con función hipofisotrófica que expresan la TRH (involucradas en la regulación del eje HHT) se encuentran localizadas en las subdivisiones medial y periventricular parvocelular del PVH y son las que proyectan hacia la ME (69, 70). En la rata, los axones terminales de estas neuronas se presentan con alta densidad en la lámina externa de la ME, muy próximos a los capilares del sistema porta-hipofisario (71). Existen neuronas que expresan TRH en otras regiones hipotalámicas tales como el POA, el

hipotálamo anterior, el núcleo supraóptico, el Arc, los núcleos dorsomedial y premamilar y la PeFLH (69, 72).

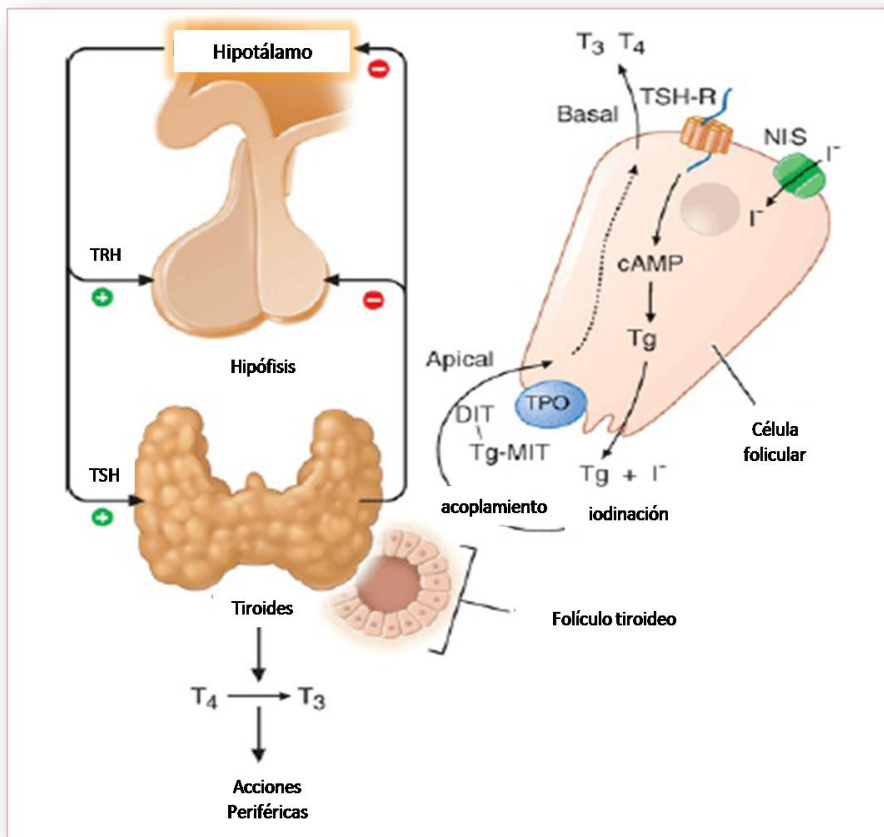


Fig. 6. Representación esquemática de la regulación del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo (HHT) y de la síntesis de las hormonas tiroideas (THs). A la izquierda se representa el mecanismo de retroalimentación positiva de la TRH (hipotalámica) sobre la TSH (hipofisaria) y de ésta sobre la glándula tiroides para la síntesis y secreción de T₃ y T₄, además del control inhibitorio de las THs sobre la TSH y la TRH. A la derecha se representa un folículo de la glándula tiroides que se encuentran formados por células epiteliales que rodean el coloide proteico donde está contenida la tiroglobulina. Las células foliculares se encuentran polarizadas y son las responsables de la síntesis de tiroglobulina de la que luego derivan T₃ y T₄. Receptor de la tirotrófina (TSH-R), tiroglobulina (Tg), cotransportador de sodio-yodo (NIS), peroxidasa tiroidea (TPO), diiodotirosina (DIT), monoiodotirosina (MIT). Modificado a partir de: Longo DL, Fauci AS, Kasper AL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th Ed. (6).

En humanos, la pp-TRH está compuesta por 242 aminoácidos y derivan de ella 6 copias de la TRH (73). Las neuronas que expresan la TRH se encuentran localizadas mayormente en la porción dorsomedial del PVH (74). Mediante estudios de hibridación in situ se ha reportado la presencia del ARNm de la pp-TRH en neuronas no sólo del PVH sino también del núcleo supraquiasmático (SCN), de la PeFLH y del LHA (75).

Las neuronas con función hipofisotrófica que expresan la TRH reciben inputs provenientes de otras áreas del cerebro; las conexiones aferentes más importantes provienen de las neuronas catecolaminérgicas de la región posterior del cerebro (76) de las cuales dos tercios de los axones expresan adrenalina, mientras que el tercio restante corresponde a NA (77, 78). También reciben inputs provenientes del Arc, tales como el NPY, la leptina, la α -MSH y el péptido similar a la proteína Agouti (AgRP- agouti-related peptide) (79, 80). Se han demostrado botones GABAérgicos con función inhibitoria sobre los somas y las dendritas de primer orden de las neuronas que expresan la TRH (81). NA regula la neurona de TRH tanto a nivel de su soma como de sus terminales ya que sus axones se proyectan a la lámina externa de la ME localizándose próximos a los que expresan TRH. Otros neurotransmisores como la serotonina, la histamina, la somatostatina, los péptidos opioides, entre otros, también regulan a las células que sintetizan este péptido.

En humanos, las neuronas hipofisotróficas productoras de la TRH se encuentran innervadas por axones cuyas terminales contienen el NPY, la AgRP y la α -MSH (82).

El procesamiento de la p-TRH llevado a cabo por las PCs es controlado por las THs a través del aumento o la disminución en la expresión de estas enzimas, bajos niveles de THs inducen un incremento en la expresión de las PCs en el PVH con mayor procesamiento de la p-TRH y posterior liberación de la TRH desde la ME y el efecto opuesto se observa ante el exceso de las THs (83).

Estudios realizados en la rata demuestran que la expresión del ARNm de la pp-TRH en las neuronas localizadas en las subdivisiones medial y periventricular parvocelular del PVH presenta una relación inversa con los niveles séricos de las THs. La T_3 ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la expresión del gen de la pp-TRH a través de la activación de sus receptores (TRs). Los TRs son receptores nucleares clase II que presentan actividad dependiente e independiente de ligando (84). Dos genes codifican para los TRs, α y β , dando lugar a cuatro isoformas: $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$, $TR\beta_2$ y $TR\beta_3$ (85, 86). Las isoformas $TR\beta$, pero no las $TR\alpha$, son capaces de mediar la represión de la TRH dependiente de ligando, siendo la porción N-terminal del receptor β el elemento clave en esta regulación. Se ha demostrado que el $TR\beta_2$ es el receptor crítico para el control negativo sobre la síntesis de la TRH (58, 87); pero un trabajo más reciente evidencia que tanto el $TR\beta_1$ como el $TR\beta_2$ contribuyen a este mecanismo, aunque de forma diferente cada uno (85).

1.2.1.2. Funciones de la TRH

La TRH es el estímulo más importante para la síntesis y la secreción de la TSH. Su acción es ejercida a través de sus receptores y su degradación es llevada a cabo rápidamente por enzimas catabólicas (88). Este péptido interviene en funciones extrahipofisotróficas tales como la regulación del humor, el sueño, la cognición, la actividad motora y sobre el sistema nervioso autónomo entre otros (69).

El mantenimiento del eutiroidismo depende de un estrecho balance en el que intervienen neuropéptidos y neurotransmisores, donde el estímulo positivo dominante sobre la TSH es la TRH y el principal control negativo es ejercido por las THs.

La TRH actúa como hormona, factor parácrino, neurotransmisor y neuromodulador, ejerciendo sus acciones a través de la interacción con receptores de membrana acoplados a proteína G (GPCR) (89, 90). Se han descrito dos receptores para esta hormona (TRH-Rs): el TRH-R1 (91) y el TRH-R2 (92, 93). Los TRH-Rs pertenecen a la familia de los receptores rodopsina/ β adrenérgicos (familia 1), de la superfamilia de los GPCR (94). Ambos se encuentran distribuidos en forma diferencial en el SNC y órganos periféricos y presentan una afinidad similar por la TRH y sus análogos. Sin embargo, el TRH-R2 se caracteriza por una mayor actividad basal y es internalizado más rápidamente que el TRH-R1 (94). En el SNC el TRH-R1 se distribuye principalmente en hipotálamo, región septal y núcleos localizados en el bulbo raquídeo y en la protuberancia; mientras que el TRH-R2 se encuentra mayormente en corteza, tálamo y región posterior del cerebro. Debido a su localización hipotalámica y por ser el receptor involucrado en la regulación del eje HHT se detallarán las propiedades del TRH-R1 que es el que nos interesa en el presente trabajo.

En el rinencéfalo y en el telencéfalo el ARNm del TRH-R1 se encuentra altamente expresado en el bulbo olfatorio, en la corteza peririnal, en la piriforme y en el núcleo endopiriforme (95) y en los núcleos lateral y medial de la banda diagonal-septal (96). Se encuentra expresado en el giro dentado ventral del hipocampo (95, 97) y en la región CA3 del cuerno de Ammón (96), en la amígdala y en el complejo nuclear córticomediale (95-97). En el diencefalo la mayoría de las áreas hipotalámicas y núcleos expresan el ARNm del TRH-R1 (95-97). En el mesencefalo y en el cerebro posterior la expresión del TRH-R1 se encuentra restringida a unas pocas áreas, incluyendo el colículo superior, el núcleo motor posterior, el núcleo motor del vago y el núcleo del tracto solitario (95-97), cuyas funciones corresponden al control neuroendócrino y a otras funciones vegetativas (94). En la adenohipófisis también hay una marcada expresión del TRH-R1 (96).

Por lo tanto, el TRH-R1 se encuentra altamente expresado en regiones cerebrales neuroendócrinas, en regiones con funciones autónomas y viscerales del SNC y en la adenohipófisis. Siendo éste el responsable de las acciones hipofisotróficas de la TRH.

1.2.1.3. Tirotrófina (TSH)

La TSH es una glicoproteína sintetizada y secretada por la adenohipófisis, constituida por dos subunidades no covalentes denominadas alfa y beta. La subunidad alfa es compartida con la FSH, la LH y la gonadotrofina coriónica. Por el contrario, la subunidad beta es exclusiva de la TSH, determinando así su especificidad biológica e inmunológica. La síntesis de cada subunidad es controlada por genes separados que se encuentran en diferentes cromosomas. Una vez sintetizadas, las subunidades son glicosiladas y posteriormente unidas para formar la TSH. La secreción de la TSH presenta un patrón pulsátil con un pico cada 2-4 horas y un ritmo circadiano con un pico nocturno de secreción y niveles bajos en las últimas horas de la tarde. Sin embargo, la amplitud relativamente baja de las pulsaciones y la vida media relativamente larga (50 min) de esta hormona, hacen que baste una sola determinación para valorar sus niveles circulantes (6). La TSH actúa a través de los GPCR localizados en las células foliculares de la glándula tiroidea constituyendo el estímulo fundamental para la síntesis y la secreción de las THs (6, 59).

1.2.1.4. Hormonas tiroideas

La glándula tiroidea es una glándula endócrina cuya función principal es la producción de las THs: T_4 y T_3 ; ambas hormonas presentan en su molécula tironinas iodadas con 4 o 3 átomos de yodo respectivamente. Un 80% de las THs son secretadas en forma de T_4 , mientras que el 20% restante corresponde a la T_3 (59). Una vez liberadas a la circulación las THs se unen reversiblemente a proteínas plasmáticas que son: la globulina de unión a tiroxina (TGB), la prealbúmina de unión a tiroxina o transtiretina (TTR) y la albúmina (6), que facilitan su transporte y entrada a los distintos tejidos, incluido el cerebro (98).

La T_3 es considerada la forma activa de las THs y es el producto de la deiodinación intracelular de la T_4 , considerándose a la T_4 como la precursora de la T_3 . La conversión de T_4 en T_3 es llevada a cabo por un grupo de enzimas llamadas deiodinasas, responsables de remover una molécula de yodo. Existen tres tipos de deiodinasas localizadas en distintas regiones del organismo: la deiodinasa tipo I se encuentra principalmente en glándula tiroidea, hígado y riñón, con una afinidad relativamente baja por la T_4 ; la deiodinasa tipo II que se expresa en hipófisis, encéfalo, grasa parda y glándula tiroidea y presenta mayor afinidad por la T_4 y permite regular localmente las concentraciones de la T_3 , además de estar regulada por las THs ya que el hipotiroidismo induce su expresión y actividad aumentando la conversión de T_4 en T_3 a nivel hipotalámico e hipofisario y la deiodinasa tipo III es responsable de convertir a la T_4 y la T_3 en formas inactivas (T_{3r} y T_2) (6, 99, 100). La actividad relativa de cada deiodinasa determina la disponibilidad de T_3 en el

cerebro. Según la especie, el estado hormonal y la edad, el balance se inclinará hacia la producción de la T_3 a partir de T_4 o a la degradación de las THs (99).

Las THs ingresan a la célula por difusión pasiva o a través de la utilización de transportadores como el monocarboxilato 8 (MCT8) y ejercen su acción principalmente a través del $TR\alpha$ y del $TR\beta$, aunque también pueden actuar activando receptores localizados en la membrana plasmática, en el citoplasma y en la mitocondria. Tanto el $TR\alpha$ como el $TR\beta$ se localizan en la mayoría de los tejidos del organismo con variaciones en su nivel de expresión: el $TR\alpha$ es abundante en el encéfalo, en los riñones, las gónadas, los músculos y en el corazón, mientras que el $TR\beta$ se expresa mayormente en la hipófisis y en el hígado. Cada receptor presenta distintas isoformas con características propias, en el caso del $TR\beta$ su isoforma $TR\beta 2$ se localiza selectivamente en el hipotálamo en la hipófisis.

Los TRs contienen un dominio central de unión al ADN y un dominio C-terminal de unión al ligando. Se unen a secuencias específicas del ADN llamadas elementos de respuesta a las THs (TREs) que se encuentran ubicados en las regiones promotoras de los genes blanco. Generalmente constituyen heterodímeros mediante la unión a los receptores X del ácido retinoico (RXRs). El receptor activado puede estimular la transcripción de genes (por ej. el de la cadena larga de miosina) o inhibir la transcripción (por ej. el del gen de la TSH), dependiendo de la naturaleza de los elementos regulatorios en los genes blanco (**Fig. 7**) (6).

Las THs se unen con afinidad similar a $TR\alpha$ y $TR\beta$, sin embargo, las diferencias estructurales a nivel de los dominios de unión al ligando son los que definen la potencialidad del efecto de cada una, esto determina que la afinidad de la unión de la T_3 sea diez a quince veces mayor que la de la T_4 y que los TRs se encuentren ocupados principalmente por T_3 . Luego de la unión al receptor la T_3 induce cambios conformacionales en el mismo llevando a la liberación de las proteínas co-represoras (CoR) (que inducen silenciamiento génico) y a la unión de las co-activadoras (CoA), lo que aumenta la transcripción. El descubrimiento de la interacción de los TRs con las CoR, explica el hecho del silenciamiento de genes en ausencia de la unión a la hormona. En consecuencia, la deficiencia hormonal tiene un profundo efecto en la expresión génica porque causa la represión de genes así como la pérdida de la estimulación inducida por la hormona. Esto ha sido corroborado mediante estudios en ratones donde se demostró que la ausencia de genes blanco de TR tiene menor efecto fenotípico que la deficiencia hormonal (6). En resumen, la actividad de los TRs es regulada por la T_3 , por la presencia de TREs localizados en los promotores de los genes blanco(85, 86), por su propia expresión y por las proteínas nucleares co-regulatorias.

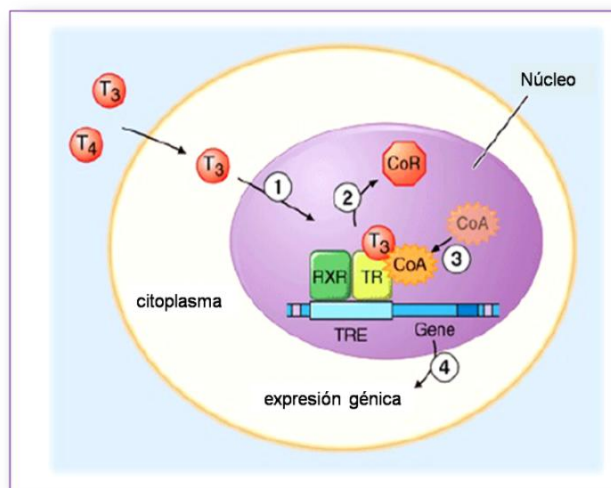


Fig. 7. Representación esquemática de la activación nuclear de los receptores de las hormonas tiroideas (TRs). Los TRs forman heterodímeros con el receptor X del ácido retinoico (RXR), este complejo se une específicamente a elementos de respuesta a las hormonas tiroideas (TRE) en las regiones promotoras de los genes blanco. En la ausencia de la hormona, el TR se une a proteínas co-represoras (CoR) que inducen el silenciamiento de la expresión de genes; cuando la T_3 ingresa al núcleo ① y se une al TR, éste se libera de la proteína CoR ② y se une a las co-activadoras (CoA) ③, lo que induce un cambio en la expresión génica ④. Modificado a partir de Longo DL, Fauci AS, Kasper AL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 18th Ed. (6).

Las acciones no genómicas de la T_3 son iniciadas a nivel de la membrana plasmática o del citoplasma; a nivel de la membrana plasmática esta hormona se une a la integrina $\alpha\beta_3$ que activa proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, llamadas originalmente ERK 1/2) y culmina con cambios a nivel de los sistemas de transporte de membrana e incluso induciendo eventos complejos como la proliferación celular (por ej. angiogénesis). A través de un mecanismo citoplasmático o mediado por la integrina $\alpha\beta_3$, la T_3 activa la fosfatidil-inositol-3-kinasa, induciendo la transcripción de genes específicos, estimulando la actividad de la Na-K ATPasa en la membrana plasmática y modulando la de la ATPasa (86).

1.2.1.5. Disfunción tiroidea: hipo- e hipertiroidismo

El hipotiroidismo primario corresponde a un déficit hormonal caracterizado por la disminución de la síntesis y la secreción de la T_4 libre por afectación de la glándula tiroides y el consecuente aumento de los niveles de la TSH. El déficit de iodo sigue siendo la causa más frecuente del hipotiroidismo primario en el mundo entero, mientras que en las áreas geográficas en las que hay suficiente iodo, la enfermedad autoinmunitaria (tiroiditis de Hashimoto) y las causas iatrogénicas (tratamiento del hipertiroidismo) son las más frecuentes. El hipotiroidismo causa astenia, somnolencia, edema generalizado de tipo mixedematoso, retención de líquido, lentitud de las funciones intelectuales, intolerancia al

frío, constipación y trastornos dermatológicos (6). El hipotiroidismo está asociado con alteraciones neuropsicológicas y emocionales; en el caso del tipo leve o subclínico, se ha demostrado que el tratamiento con L-T₄ protege al cerebro del riesgo de alteraciones cognitivas y afectivas (101). La depresión melancólica e incluso la demencia pueden ser las manifestaciones clínicas de un hipotiroidismo severo (102).

Respecto a la interacción entre el eje HHT y el eje HHG, estudios clínicos y experimentales, indican que presentan una relación de mutua dependencia tanto en situaciones fisiológicas como patológicas (103). En la clínica, la afectación del eje HHG se evidencia en ambos sexos; en las mujeres con hipotiroidismo crónico se observa oligomenorrea, amenorrea o menorragia, disminución de la fertilidad y aumento de la incidencia de abortos espontáneos. Los niveles de la prolactina a menudo presentan una elevación discreta y pueden contribuir a las alteraciones de la libido y de la fertilidad, así como provocar galactorrea (6). El hipotiroidismo es menos frecuente en el hombre, en ellos se observa disminución en los niveles circulantes de la globulina transportadora de esteroides sexuales (SHBG), de la concentración total de la testosterona y reducción de los valores de la testosterona libre en el 60 % de los pacientes (104), además pueden presentar disminución de la libido, disfunción eréctil, retraso en la eyaculación (105) y alteraciones en la espermatogénesis (104, 106).

La interacción entre el eje HHT y el eje HHG está confirmada por la presencia de TRs a nivel ovárico que modulan la función de este órgano (107) y la acción de los estrógenos sobre el eje HHT (103, 108); en el género masculino también se ha demostrado la presencia de TRs en las células de Sertoli localizadas en los túbulos seminíferos (106).

En los modelos experimentales de inducción del hipotiroidismo en la rata hembra se ha observado afectación del ciclo sexual (109, 110), la fertilidad y del éxito de la preñez (111), disminución en los niveles basales de la LH en plasma tanto en el día del diestro como en el del proestro, aumento de las concentraciones de prolactina y progesterona (112) y sensibilidad alterada a las gonadotrofinas (109) con predisposición al síndrome de ovario poliquístico. También se ha demostrado gestación prolongada, menor número de fetos y aumento del riesgo de muerte fetal (113, 114). En la rata macho adulta la inducción del hipotiroidismo tiene poco efecto sobre la histopatología de los testículos, la espermatogénesis o la concentración de la testosterona en suero (104, 115), sin embargo se ha señalado que a nivel mitocondrial induce un estado de estrés oxidativo que altera la función testicular y que no revierte con la administración de la T₃ (106, 116).

El hipertiroidismo es un tipo de tirotoxicosis caracterizado por el aumento de la síntesis y la secreción de las THs debido a la hiperfunción de la glándula tiroidea. Su causa

más frecuente es la Enfermedad de Graves que corresponde a un trastorno autoinmunitario, más frecuente en mujeres que en hombres, que afecta a individuos entre los 20 y 50 años de edad. Los síntomas y signos del hipertiroidismo son: nerviosismo, insomnio, hiperactividad, pérdida de peso (con apetito conservado o aumentado), diarrea, taquicardia, sudoración caliente, temblor, bocio, trastornos oculares, entre otros (6). En la mujer, el hipertiroidismo crónico es responsable de alteraciones a nivel del eje HHG produciendo oligomenorrea, ciclos anovulatorios (103) y aumento de nacimientos prematuros (117). En el hombre se observa aumento en los niveles circulantes SHBG, de la concentración total de la testosterona, aunque con valores subnormales de testosterona libre (104, 106), además pueden presentar alteraciones a nivel del comportamiento sexual con disminución de la libido, disfunción eréctil, retraso o precocidad en la eyaculación (105) y alteraciones en la espermatogénesis (101).

En la rata hembra adulta la administración de dosis altas de T_4 da lugar a largos períodos de diestro con pocos folículos maduros o cuerpos lúteos, así como aumento (o no) en la concentración de la LH en la adenohipófisis y disminución de los niveles circulantes de la misma. En los machos la administración de la T_4 induce un aumento de los niveles de gonadotrofinas en suero y afectación de la espermatogénesis (104, 106).

La importancia de la acción de las THs en el cerebro adulto se ha observado en estudios clínicos realizados en humanos con hipo- e hipertiroidismo asociados a trastornos neurológicos y psiquiátricos (118–120). Los modelos de inducción del hipo- e hipertiroidismo en la rata son utilizados para estudiar los efectos del déficit o del exceso de las THs sobre distintas moléculas fundamentales para la actividad del SNC.

Es importante tener en cuenta que en el modelo de inducción del hipotiroidismo con 6-propil-2-tiouracilo (PTU) Kundu *S et al.* demostraron, mediante el análisis de sinaptosomas de la corteza cerebral de ratas macho, que existe a este nivel un mecanismo auto-regulatorio encargado de mantener valores estables de T_3 denominado “homeostasis central de las THs” que corresponde al estado intermedio entre el comienzo de la disminución de las THs a nivel periférico y la reducción de su concentración a nivel del SNC (121). Este mecanismo es llevado a cabo por un aumento en la actividad de la deiodinasa tipo II, con utilización de la T_4 circulante para convertirla a T_3 y una disminución en la actividad de la deiodinasa tipo III. Por lo tanto, a pesar de la reducción de los niveles circulantes de las THs, en el SNC los valores de la T_3 se mantienen normales hasta el día 20 pos-inducción (121–124). Por el contrario, el modelo de hipertiroidismo induce cambios a nivel central con la administración de una única o múltiples dosis de T_3 (125).

En el presente trabajo se estudiará la relación del neuropéptido EI con otras moléculas que intervienen en mecanismos regulatorios a nivel del SNC tales como la TH y la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), por lo que resultados de otros autores respecto a su modificación en el hipo- y en el hipertiroidismo deben ser tenidas en cuenta. Se ha demostrado que la inducción del hipotiroidismo con PTU durante 21 días tiende a disminuir la concentración de la TH en el locus coeruleus de la rata adulta, mientras que el hipertiroidismo inducido con L-T₄ 250 µg/kg/día la incrementa a los 3 días pero, la disminuye a los 17 días pos-inducción (126). En cuanto a la GAD, gran porcentaje de las células MCH-ir presentan ARNm correspondiente a GAD-65 y GAD-67 (127) y ha sido demostrado que las neuronas de MCH reciben señales tanto inhibitorias como estimuladoras (46). El sistema GABAérgico es sensible a las hormonas tiroideas, sin embargo existen resultados contradictorios en cuanto a si aumenta o disminuye su actividad tanto en el hipo- como en el hipertiroidismo. De acuerdo a la bibliografía, en el hipotiroidismo inducido en la rata adulta la actividad de la GAD se encuentra generalmente aumentada, al contrario de lo que sucede en los neonatos (98). En la inducción del hipotiroidismo con carbimazol los niveles del GABA aumentan en la corteza y en el hipotálamo (128). En otro estudio se observó un aumento en la actividad de la GAD en la corteza visual de ratas adultas hipotiroideas (129). En relación al hipertiroidismo, hay un trabajo que demuestra que la administración intraperitoneal de L-T₄ induce una disminución de los niveles de GABA en el tálamo e hipotálamo (128), mientras que en otro, donde se evalúa su concentración en todo el cerebro, no se observaron cambios (130).

El hipo- y el hipertiroidismo representan dos de las patologías endocrinológicas más frecuentes en humanos y en un gran porcentaje de estos pacientes se observa afección del eje HHG y alteraciones a nivel neuropsiquiátrico. Los mecanismos involucrados en dichas manifestaciones clínicas pueden ser mediados en forma directa por el déficit o el exceso de las THs, a través de acciones genómicas y no genómicas, e indirecta, a través de neuropéptidos y neurotransmisores. El neuropéptido EI, que se encuentra involucrado en la regulación de la LH y del comportamiento, podría ser una de las moléculas reguladas por las THs y un posible modulador o intermediario en los efectos del hipo- e hipertiroidismo a nivel del SNC y sobre el eje HHG.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar si el hipo- o el hipertiroidismo inducen cambios en la expresión del neuropéptido EI, en áreas discretas del SNC involucradas en la regulación del eje HHG, el control metabólico y el comportamiento en ratas con disfunción tiroidea.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.2.1. Determinar la concentración de NEI en áreas hipotalámicas, de ratas macho adultas y hembras durante el ciclo estral, eutiroideas, hipo- e hipertiroides y correlacionar las posibles modificaciones de la misma con los niveles de la LH, el estradiol, la progesterona y la testosterona.

1.3.2.2. Analizar las modificaciones que la disfunción tiroidea puede ejercer sobre la expresión de NEI en fibras y somas NEI-ir en áreas hipotalámicas involucradas en la reproducción y el comportamiento.

1.3.2.3. Determinar la relación de NEI, TH y GAD-67 en áreas hipotalámicas con presencia de somas NEI-ir.

1.3.2.4. Analizar la presencia del TRH-R1 en cuerpos y fibras neuronales próximas a NEI y la posible colocalización con el péptido.

1.4. HIPÓTESIS GENERAL

La relación del neuropéptido EI con el eje HHT ha sido pobremente estudiada previamente. En el presente trabajo se plantea que tanto el déficit como el exceso de las THs podrían ejercer cambios a nivel de la concentración y de la expresión celular de NEI en áreas específicas del hipotálamo de la rata y que la afectación de los sistemas dopaminérgico y GABAérgico podría intervenir en dicho efecto. Por otro lado, si NEI es capaz de inhibir la liberación de la TRH, la presencia del TRH-R1 en los somas que expresan el péptido demostraría la acción de TRH sobre los mismos, siendo otro punto de interacción entre el eje HHT y el neuropéptido EI.

Las manifestaciones clínicas a nivel del eje HHG y neurocognitivo observadas en el hipo- y en el hipertiroidismo podrían deberse a modificaciones en la concentración, síntesis, liberación y degradación de NEI como consecuencia directa del déficit o del exceso de las THs y de la acción de la TRH o indirecta a través de efectos sobre los sistemas que regulan los somas y las terminales que expresan NEI.

CAPÍTULO 2
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Animales y tratamiento

2.1.1. Experimento nº 1

2.1.1.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 10-16 semanas de edad con un peso de 220-340 g, nacidas y criadas en el laboratorio. Las condiciones del bioterio se mantuvieron constantes, con un ciclo luz/oscuridad 14/10 y temperatura controlada (22 ± 2 °C). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento. Los procedimientos realizados fueron consistentes con los estándares establecidos por la "Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud" (NIH, 1996) y la "Guía de la Asociación Médica Veterinaria Estadounidense sobre Eutanasia".

2.1.1.2. Tratamiento

El hipotiroidismo (hipoT) fue inducido con 6-propil-2-tiouracilo (PTU, P3755, Sigma, EE.UU.) a una concentración de 0.1 g/l administrado por vía oral (VO) en el agua de bebida (131) durante dos períodos de distinta duración, uno corto (7 días) y uno largo (24 días); éstos fueron seleccionados en base a los resultados publicados por Kundu S *et al.* que demuestran que a nivel del SNC existe un mecanismo denominado "homeostasis central de las THs" que permite mantener valores normales de las THs por aproximadamente 20 días luego de iniciarse la inducción del hipotiroidismo (121). Por lo tanto, si se plantea como hipótesis que el contenido de NEI es modulado por los cambios en las concentraciones cerebrales de las THs, es posible que sea necesario un plazo mayor (21-24 días) para inducir modificaciones en la concentración del péptido en las distintas áreas cerebrales. El hipertiroidismo (hiperT) fue inducido con L-tiroxina (L-T₄, T2376, Sigma, EE.UU.) a una dosis de 250 µg/kg/día administrados por vía subcutánea (SC) durante 4 días (132). Los animales controles fueron mantenidos en las mismas condiciones de alimentación, ciclo luz/oscuridad y temperatura que los tratados. Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos:

- control-AM (n = 8-12)-sacrificados por la mañana (10:00-12:00)
- control-PM (n = 8-12), sacrificados por la tarde (17:00-19:00)
- hipoT-7-AM (n = 6-8), hipotiroideos, sacrificados por la mañana (10:00-12:00) en el día 7 pos-inducción
- hipoT-7-PM (n = 6-8), hipotiroideos, sacrificados en la tarde (17:00-19:00) en el día 7 pos-inducción
- hipoT-24-AM (n = 6-8), hipotiroideos, sacrificados por la mañana (10:00-12:00) en el día 24 pos-inducción

- hipoT-24-PM (n = 6-8), hipotiroideos, sacrificados en la tarde (17:00-19:00) en el día 24 pos-inducción
- hiperT-AM (n = 6-8), hipertiroideos, sacrificados por la mañana (10:00-12:00) en el día posterior a la administración de la cuarta dosis de L-T₄.
- hiperT-PM (n = 6-8), hipertiroideos, sacrificados en la tarde (17:00-19:00) en el día posterior a la administración de la cuarta dosis de L-T₄.

2.1.2. Experimento nº 2

2.1.2.1. Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembra adultas de 10-14 semanas de edad, de 180-220 g, nacidas y criadas en el laboratorio, con 2 ciclos estrales regulares consecutivos. Las condiciones del bioterio, alimentación e hidratación de los animales y las normas seguidas en los procedimientos fueron las establecidas en el experimento nº 1.

2.1.2.2. Identificación de las fases del ciclo estral

Para reconocer las distintas fases del ciclo estral, determinar la regularidad del mismo y familiarizar a los animales con el procedimiento, se tomaron muestras de exudado vaginal mediante la utilización de una pipeta Pasteur con NaCl 0.9%, durante 8 días consecutivos a partir de las 10 am. Cada muestra se colocó en un portaobjeto y se observó mediante microscopio óptico a 20x. El tipo celular predominante permitió establecer la fase correspondiente del ciclo: proestro (P, células epiteliales nucleadas), estro (E, células epiteliales cornificadas), segundo día del diestro (D₂, leucocitos) (133). Fueron seleccionados para el estudio aquellos animales que presentaron dos ciclos regulares consecutivos de 4 días de duración.

2.1.2.3. Tratamientos

En los grupos de hembras hipoT e hiperT el comienzo de la administración del tratamiento se realizó en el día del E. El hipoT fue inducido mediante PTU a una concentración de 0.1 g/l administrada en el agua de bebida (131) durante 7 a 9 días. El hiperT se indujo con L-T₄ 250 µg/kg/día administrada SC (134) durante 4 a 7 días. Los animales controles fueron mantenidos en las mismas condiciones de alimentación, ciclo luz/oscuridad y temperatura que los tratados. La distribución se realizó en los distintos grupos bajo estudio (control, hipoT e hiperT, n=6-8/grupo) y se sacrificaron en la mañana del día del P (P-AM, 10:00 - 12:00 h), en la tarde del día del proestro (P-PM, 17:00-19:00

h), en la mañana del día del estro (E-AM, 10:00-12:00) y en la mañana del segundo día del diestro (D₂-AM, 10: 00-12:00).

2.1.3. Experimento nº 3

2.1.3.1. Animales

Se utilizaron un total de 18 ratas macho de la cepa Wistar de 11-13 semanas de edad con un peso de 250 a 320 g al comienzo del tratamiento, nacidos y tratados en el Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU), con acceso a agua y comida *ad libitum* y ciclo luz/oscuridad del bioterio: 14/10 h, mantenidos a una temperatura 22 ± 2 °C. Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de 6 individuos cada uno. Se mantuvieron las normas éticas expresadas anteriormente.

2.1.3.2. Tratamientos

- HipoT: Se administró PTU 0.1 g/litro en agua de bebida durante 21 días, considerando el primer día de tratamiento como día cero y sacrificando el animal en el día 21.
- HiperT: Se administró L-T₄ 250 µg/kg/día SC durante 21 días sacrificando al animal el día posterior a la última dosis.
- Controles: mantenidos en las mismas condiciones de ciclo luz/oscuridad, temperatura y acceso a agua y comida que los otros grupos.

2.2. Obtención de las muestras y procesamiento

2.2.1. Experimentos nº 1 y nº 2

2.2.1.1. Obtención de las muestras

Los animales fueron sacrificados por decapitación rápida, la sangre del tronco fue recolectada inmediatamente y almacenada a 4 °C hasta su procesamiento. En cada uno se realizó la apertura de la calota craneana y se extrajo en primer lugar la glándula pineal (Pi), luego se retiró el cerebro y se lo colocó inmediatamente en una matriz de aluminio a 4 °C específica para la realización de cortes coronales (GBR 4000C; ASI Instruments, Inc., Warren, MI, EE.UU.). Posteriormente se extrajo la PP. Pi y PP se colocaron por separado en 100 µl de HCl 0.06 N y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Cada cerebro fue seccionado en 5 segmentos coronales de aproximadamente 1 mm (0.7 a 1 mm) de espesor. Los parámetros anatómicos considerados para la realización de los cortes fueron: anteriores, porción caudal de los tubérculos olfatorios y región ventral del quiasma óptico (aproximadamente a 0.12 mm del Bregma); y posterior, el extremo caudal de la ME

(aproximadamente a -3.48 mm del Bregma). Para la realización de cada corte se utilizaron láminas metálicas Gillette®. Cada segmento obtenido se colocó delicadamente sobre un portaobjeto a 4 °C, se observó bajo lupa y se disecaron las áreas de interés de acuerdo a los reparos anatómicos brindados por el Atlas de Paxinos&Watson (135). Para la disección se utilizó la punta de una aguja (calibre 23 x 1", Terumo, Tokio, Japón). La extracción y agrupamiento de las áreas de interés fue realizada como se detalla a continuación: del 1^{er} segmento, el órgano vasculoso de la lámina terminal junto con el núcleo antero-ventroperiventricular (OVLT + AVPV); de los segmentos 1^{ro} y 2^{do}, el área preóptica lateral y medial (LPO + MPA: POA); de los segmentos 2^{do} y 3^{ro}, el núcleo periventricular (Pe); del 3^{ro}, el núcleo paraventricular hipotalámico (PVH) ; de los segmentos 3^{ro} y 4^{to}, la porción peduncular del hipotálamo lateral (PLH); del 4^{to}, la región perifornical del hipotálamo lateral (PeFLH); y de los segmentos 4^{to} y 5^{to}, la eminencia media junto con el núcleo arcuato (ME + Arc) (**Fig. 8**). En el experimento n^o 2 también se extrajo de los segmentos 3^{ro} y 4^{to} el área incerto-hipotalámica (IH_y).

2.2.1.2. Preparación de los extractos de tejidos

Cada una de las muestras obtenidas fue homogenizada en 100 µl de HCl 0.06 N y colocada en baño de María a 100 °C durante 10 min, luego fue centrifugada a 3000 rpm en centrífuga refrigerada a 4 °C, separando de esta manera el sobrenadante del sedimento. Posteriormente, cada sobrenadante (sobrenadante 1) fue recogido y colocado en un nuevo eppendorf y el sedimento fue resuspendido en 100 µl de HCl 0.06 N. Una segunda centrifugación se realizó bajo las mismas condiciones obteniendo un segundo sobrenadante. Los sobrenadantes 1 y 2 fueron colocados juntos y almacenados a -20 °C hasta la realización del radioinmunoensayo (RIA) correspondiente. En el sedimento se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (136). La sangre troncal fue centrifugada a 3000 rpm durante 20 min a 4 °C para la obtención del suero, que luego se utilizó en RIAs específicos para la determinación de TSH, T₃ y T₄ totales, LH, estradiol, progesterona y testosterona según corresponda.

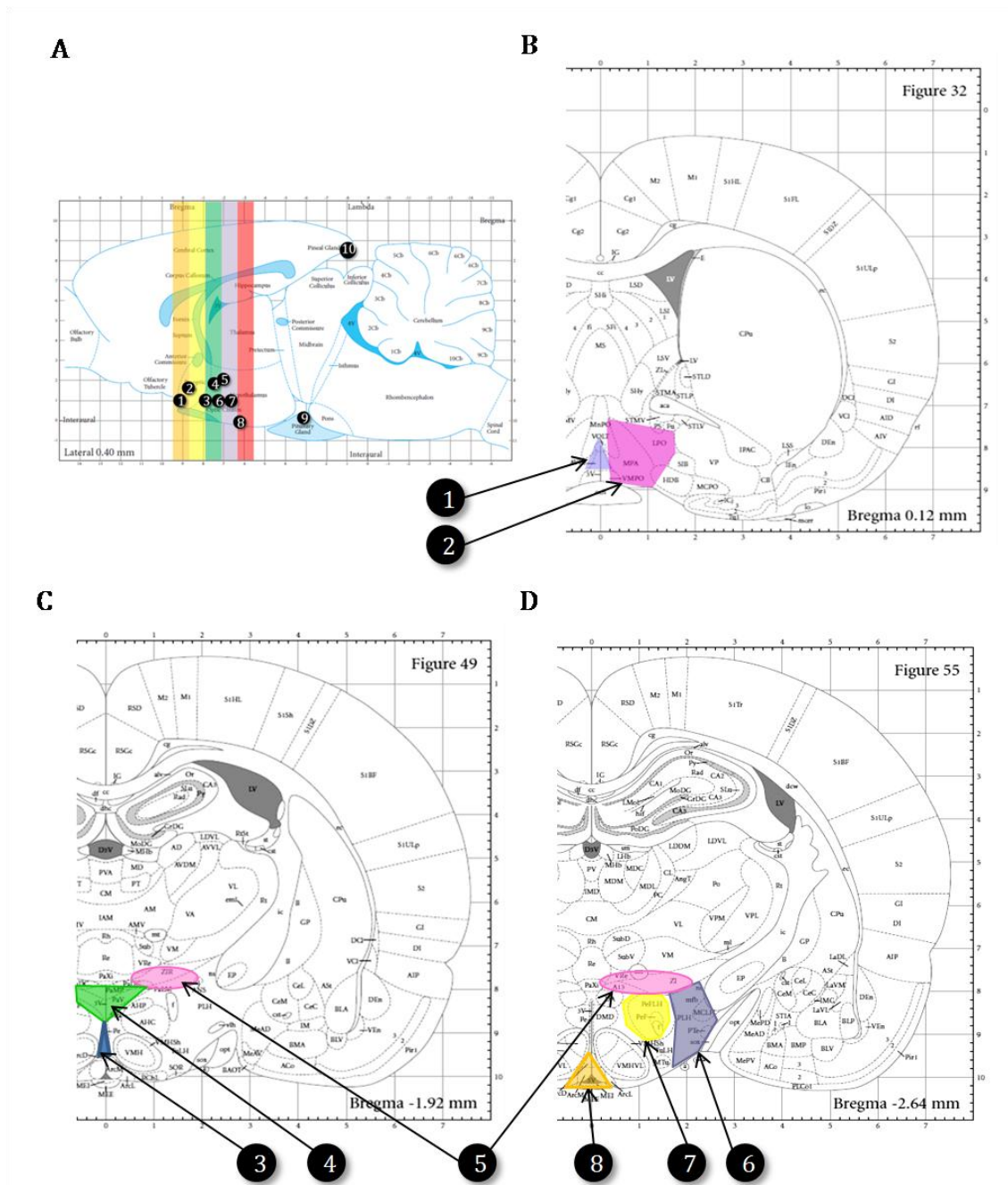


Fig. 8. Representación esquemática de las distintas áreas cerebrales disecadas. **A.** Representación de un corte sagital del cerebro de la rata y la localización aproximada de las áreas de interés. **B, C y D** corresponden a esquemas de cortes coronales del cerebro de la rata a distintas distancias del Bregma, con la indicación de las áreas que fueron disecadas: **1** órgano vasculoso de la lámina terminal junto con el núcleo antero-ventroperiventricular (OVLT + AVPV); **2** área preóptica lateral y medial (LPO + MPA: POA); **3** núcleo periventricular; **4** núcleo paraventricular hipotalámico (PVH); **5** área incerto-hipotalámica (IHy); **6** porción peduncular del hipotálamo lateral (PLH); **7** región perifornical del hipotálamo lateral (PeFLH); **8** eminencia media junto con el núcleo arcuato (ME + Arc); **9** neurohipófisis (PP); **10** glándula pineal (Pi). Modificado a partir del Atlas Paxinos&Watson, 2007 (135).

2.2.2. Experimento n° 3

2.2.2.1. Procedimiento para obtención de los tejidos

Los animales fueron sacrificados entre las 10:30 y las 12:30 am. La inducción del plano anestésico profundo se realizó con hidrato de cloral ($\text{CCl}_3\text{-CH(OH)}_2$) 30%, 67 $\mu\text{l}/100$ gr de peso, inyectado por vía intraperitoneal; la flaccidez corpórea y la ausencia de respuesta al estímulo doloroso de la cola fueron tomados como parámetros para el inicio de la cirugía. Los cerebros de los animales utilizados en estos experimentos fueron fijados mediante perfusión transcardíaca realizada mediante la utilización de una bomba de perfusión digital (GILSON M312, EE.UU.) a un flujo constante. Primero se perfundieron 130 ml de solución de lavado (ClNa 0.8%, glucosa 0.4%, sacarosa 0.8% en H_2O bidestilada, SO_3Na_2 44 mg/litro) y luego se procedió al pinzamiento de la aorta descendente; posteriormente se perfundieron 250 ml de paraformaldehído al 4% (Paraformaldehyde Puriss, Cat. n° 16005, Aldrich, Alemania) en PBS 0.1 M pH 7.3-7.4, con adición de SO_3Na_2 44 mg/litro. Al finalizar se realizó la apertura de la calota craneana para la extracción del cerebro y la glándula hipófisis. Los tejidos fueron colocados en frascos de vidrio conteniendo solución fijadora hasta el día siguiente. Para su crioprotección, las muestras fueron colocadas en soluciones crecientes de sacarosa (10, 20 y 30 % en PBS 0.01 M pH 7.4), manteniéndolas en cada una de las concentraciones el tiempo necesario hasta que descendieran al fondo del frasco. Luego se lavaron con PBS 0.01 M, se secaron delicadamente con papel absorbente y se congelaron en isopentano (Tetrahedron, Argentina) sumergido en nitrógeno líquido. Las muestras se guardaron a -70 °C hasta su utilización.

2.2.2.2. Obtención de cortes histológicos

De los cerebros se obtuvieron secciones coronales de 30 μm de espesor utilizando un crióstato (MICROM HM 505E). Se colocaron 5 secciones consecutivas por pozo en placas de cultivo de 12 o 24 compartimientos, sumergidas en solución PBS pH 7.4 + NaN_3 0.03% para conservarlas hasta su utilización. Los parámetros anatómicos para la obtención de los cortes fueron acorde a lo establecido en el Atlas Paxinos&Watson (137), tomando los segmentos comprendidos entre 0.12 mm y -3.48 mm del Bregma (**Fig. 9**).

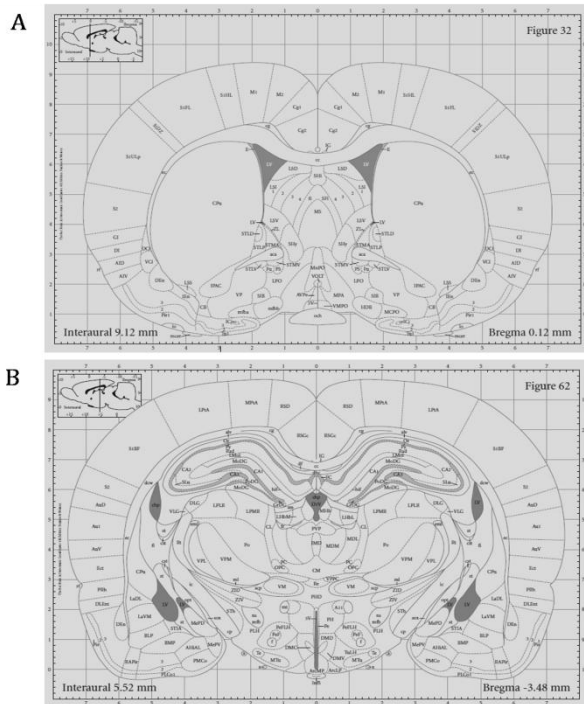


Fig. 9. Representación esquemática de los cortes coronales del cerebro de la rata entre los que se tomaron las muestras. A. Corresponde a 0.12 mm de distancia del Bregma; B. corte esquemático a -3.48 mm del Bregma. Modificado a partir del Atlas Paxinos&Watson, 2007 (135).

2.3. Métodos

2.3.1. Experimentos nº 1 y nº 2

2.3.1.1. Radioinmunoanálisis

2.3.1.1.1. Características del anticuerpo anti-NEI

El Ac anti-NEI es un Ac policlonal realizado en conejo, PBL#237 y fue cedido para nuestro trabajo amablemente por los Dres. Sawchenko PE y Bittencourt JC. Reconoce principalmente a NEI amidado, NEI-G y formas NEI-GR y pobremente a otros derivados de p-MCH incluso al mismo precursor (19). Por lo tanto las concentraciones de NEI-ir son un indicador confiable de los niveles del péptido (7). Además, en la bibliografía ha sido ampliamente demostrado que el RIA de NEI es altamente específico (7, 19, 41).

2.3.1.1.2. Determinación de NEI

Previo al ensayo, cada sobrenadante fue tratado con 50 µl de buffer fosfato (PBS) 250 mM para alcanzar un pH de 7. La determinación de NEI por RIA fue realizada de acuerdo a lo publicado por Parkes D *et al.* en 1992 (22). Para dicho procedimiento se utilizó Tyr-NEI (Bachem, Torrance, CA, EE.UU.) que fue radio-iodinado con ¹²⁵I mediante la utilización de cloramina T. El yodo unido y libre fueron separados en una columna de Sephadex G25 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) utilizando buffer ácido-acético 0.2 M como tampón de elución. El RIA se realizó mediante la incubación de 50 µl de cada muestra con el Ac PBL#237 adecuadamente diluido y ¹²⁵I-Tyr-NEI (9000-10000 cpm), en un volumen final de 300 µl en PBS + 0.1% de NaN₃ + 0.1% de BSA + 0.33% de suero normal de conejo + 33

mM EDTA, por 20-24 horas a 4 °C. ¹²⁵I-Tyr-NEI, unido y libre, se separaron mediante una serie de pasos que incluyeron la incubación por 60 min con 50 µl de Ac de cabra anti-conejo (1:15) en PBS, la adición de 25% de polietilenglicol 6000 y una posterior centrifugación a 3000 rpm durante 30 min a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron y en los sedimentos la radioactividad fue medida en un contador de radiaciones gamma. La sensibilidad del ensayo fue de 1 pg/tubo; los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron <10%. La concentración final de NEI fue expresada en función de los mg de proteínas correspondientes a cada muestra: NEI ng/mg de proteína.

2.3.1.1.3. Determinaciones hormonales

Para la determinación de la LH y de la TSH se utilizaron materiales gentilmente cedidos por el Dr. Parlow AF y el NHPP (National Hormone and Pituitary Program, Harbor-UCLA Medical Center, de Torrance, CA, EE.UU.). Las hormonas fueron radio-iodinadas con ¹²⁵I utilizando el método de la cloramina T y se purificaron en una columna de Sephadex G75. Los resultados fueron expresados en términos de las preparaciones estándar de TSH y de LH-RP-3. La sensibilidad del ensayo fue de 0.5 µg.l⁻¹ y el coeficiente de variación intra-ensayo fue inferior al 10% para ambos RIAs. Todas las muestras correspondientes a cada experimento se midieron por duplicado en el mismo ensayo.

La T₃ y la T₄ totales se determinaron en todas las muestras del experimento n° 1 y en P-AM en el experimento n° 2 mediante la utilización de kits comerciales (Coat-A-Count, Siemens Medical Solutions, Los Ángeles, CA, EE.UU.).

El estradiol total se determinó en las muestras del experimento n° 2 mediante kit comercial de RIA (Coat-A-Count, Siemens Medical Solutions, Los Ángeles, CA, EE.UU.).

La progesterona fue determinada en el experimento n° 2 utilizando un kit comercial de RIA (RIA Coated tube, IM1188, Immunotech®, Beckman Coulter Company, Francia).

La testosterona fue determinada en suero acidificado (5µl de HCl 0.1 N/50 µl de muestra de suero) con kit comercial (KIP1709; DIAsource inmunoensayos SA, Nivelles, Bélgica) sólo en las muestras del experimento n° 1.

2.3.2. Experimento n° 3

2.3.2. A. Experimento n° 3-A

2.3.2. A.1. Inmunohistoquímica (IHQ)

2.3.2. A.1.1. Anticuerpo primario y puesta a punto de la IHQ

El Ac anti-NEI, PBL#237, es un Ac desarrollado en conejo que ha sido utilizado para el reconocimiento del péptido en la rata desde el año 1992 (16). Para la puesta a punto de este Ac se probaron distintas diluciones del mismo acorde a lo reportado previamente en

la bibliografía. Además, se establecieron las diluciones necesarias de H₂O₂ (utilizada para bloquear la reacción de peroxidación endógena), Tritón X-100 (detergente, utilizado para permeabilizar la membrana plasmática) y de suero normal de cabra (bloqueante de la reacción inespecífica) para ser utilizados en la IHQ de acuerdo a la localización y características de las moléculas que serían marcadas.

2.3.2. A.1.2. Selección de los cortes histológicos y protocolo de incubación

A partir de cada uno de los cerebros de los 3 grupos de animales (control, hipoT, e hiperT, n=3 por cada uno) se seleccionaron los cortes de acuerdo a las distancias al Bregma y a las áreas de interés: 2 cortes a -0.36 mm (LPO y MPA), 2 a 4 cortes entre -1.92 a -2.04 mm (IHy), 4 a 6 cortes entre -2.28 y -2.40 mm (IHy y PLH), 4 a 6 cortes entre -2.76 a -2.92 mm (PLH y PeFLH) y fueron distribuidos por tratamiento y distancia al Bregma en una placa multi-well de incubación. A un corte de cada grupo y distancia al Bregma se lo utilizó como inespecífico omitiendo la adición de los Acs primarios. Previo al comienzo del protocolo, se lavaron 3 veces x 5 min con PBS 0.01 M pH 7.4 para eliminar la NaN₃. Durante el primer día del protocolo, con la finalidad de exponer los sitios antigénicos, los cortes se incubaron en buffer citrato 10 mM pH 6 durante 4 min en Baño María a 95 °C. Posteriormente la placa se dejó sobre la mesada durante 15 min a temperatura ambiente, realizando después 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0.01 M. Posterior al último lavado se adicionó H₂O₂ 1% en PBS 0.01 M x 20 min. Se lavaron 3 veces x 5 min y luego se incubaron en solución de bloqueo antigénico (PBS 0.01 M + suero normal de cabra (NGS) 1% + Tritón X-100 0.3%) durante 60 min. Se retiró la solución de bloqueo y se les agregó Ac-anti-NEI 1:1000 + NGS 1% + Tritón X-100 0.3% en PBS 0.01M y se los dejó durante toda la noche a temperatura ambiente y agitación constante. El segundo día, se lavaron los tejidos con PBS 0.01 M 3 veces x 5 min y luego se les adicionó Ac secundario-biotinilado anti-conejo 1:200 + NGS 1% en PBS 0,01 M en agitación constante durante 90 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados x 5 min con PBS 0.01 M y se incubaron los tejidos con Extravidina-peroxidasa-HRP (ExtrAvidin®-Peroxidase, E2886, Sigma, EE.UU.) 1:100 durante 60 min. Posteriormente se realizó 1 lavado x 5 min con PBS 0.01 M y 2 lavados x 5 min con TBS 0.05 M. Luego se realizó 1 lavado con 3,3'-diaminobencidina tetrahidrocloruro (DAB, P5637, Sigma, EEUU.) preparada 5 mg en 10 ml de TBS 0.05 M (filtrada) + 3 µL H₂O₂ 30% inmediatamente previo a la realización de la reacción; la solución de DAB se dejó en contacto con el tejido hasta que tomara color. Los cortes se lavaron 2 veces con TBS 0.05 M y 1 con agua bidestilada. Luego se montaron en portaobjetos gelatinizados, se dejaron secar y se colocó el cubreobjetos con DPX (44581, Sigma, EEUU.).

2.3.2. A.1.3. Digitalización de las imágenes

Se utilizó un microscopio óptico, las áreas seleccionadas para ser estudiadas fueron ubicadas con el objetivo 10x y las imágenes se adquirieron con el objetivo 40x. La obtención de las mismas se realizó de ambos hemisferios y en forma consecutiva. El número de imágenes adquiridas acorde a la distancia del Bregma fue la siguiente: a -0.36 mm 2 campos en LPO y 2 campos en MPA; de -1.92 a -2.04 mm se tomaron 4-5 campos; de -2.28 a -2.40 mm, 13 campos; y de -2.76 a -2.92 mm, 9 campos.

2.3.2. A.1.4. Cuantificación de las puntas y células NEI-ir

Se utilizó el software Image J. En el LPO y MPA se realizó la conversión de las imágenes a 8 bit, se normalizaron brillo y contraste y se realizó la cuantificación de las partículas -ir de cada hemisferio.

La cuantificación de los somas NEI-ir se realizó en el IHy, la PLH, la PeFLH y el PeF, cuantificando el número total de somas por cada campo, realizándose la sumatoria de los campos correspondientes a cada área. Los resultados obtenidos en un hemisferio se promediaron con los del contralateral por cada uno de los cortes estudiados.

2.3.2. B. Experimento nº 3-B

2.3.2. B.1. Inmunofluorescencia (IF)

2.3.2. B.1.1. Anticuerpos primarios y puesta a punto de la IF

Se utilizaron los siguientes Acs: anti-NEI (ver punto **2.3.2. A.1.1.**), anti-TH, anti-GAD-67 y anti-TRH-R1. Anti-TH y anti-GAD-67 son dos Ac ratón-anti-rata; anti-TH es un Ac monoclonal donado por el Dr. Claudio Cuello (Departamento de Farmacología, Universidad McGill, Montreal, Canadá); anti-GAD-67 corresponde a un Ac comercial, GAD-67 [K-87]-Neuronal Marker (ab26116, Abcam), monoclonal tipo IgG1, que reconoce específicamente a GAD-67 y no presenta reactividad cruzada con GAD-65; el clon K-87 permite reconocer la enzima en soma, dendritas y axón; el Ac anti-TRH-R1 es un Ac comercial, TRH-R1 (I-20) (sc-11574, Santa Cruz Biothechnology, Inc), policlonal en cabra dirigido contra el extremo C-terminal del TRH-R1 de rata. Para la puesta a punto de cada uno de los Acs se probaron distintas diluciones de los mismos acorde a lo reportado previamente en la bibliografía o a lo recomendado por el fabricante. Además se establecieron las diluciones necesarias de Tritón X-100, de NGS y suero de caballo.

2.3.2. B.1.2. Selección de los cortes histológicos y protocolo de incubación

A partir de los cerebros de los tres grupos de animales (control, hipoT e hiperT) se seleccionaron los cortes correspondientes a las distancias del Bregma que incluyeran el

IHy, la PLH, el PeF y la ME. Éstos se distribuyeron de a 2 o 3 por cada cámara de una placa multi-well de incubación, agrupados por tratamiento y cuidando de que correspondieran a la misma distancia del Bregma para el posterior análisis comparativo. Se seleccionó un corte de cada grupo para ser utilizado como inespecífico. Previo al comienzo del protocolo, los cortes se lavaron 3 veces x 5 min con PBS 0.01 M pH 7.4 para eliminar la NaN_3 . Para exponer los sitios antigénicos se incubaron en buffer citrato 10 mM pH 6 idem a lo descrito anteriormente.

2.3.2. B.1.3. IF doble de NEI y TH o de NEI y GAD-67

Durante el primer día de incubación se trabajó sobre una plancha de hielo para la mejor preservación del tejido; se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0.01 M, para luego incubar los cortes en solución de bloqueo antigénico (PBS 0.01 M + NGS 1% + Tritón X-100 0.3%). Luego se retiró la solución de bloqueo y se les agregó Ac-**anti-NEI 1:1000** + NGS 1% + Tritón X-100 0.3% en PBS 0.01M y se los dejó durante toda la noche en cámara fría y agitación constante. En el segundo día se lavaron los tejidos con PBS 0.01 M 3 veces x 5 min y luego se les adicionó el Ac-secundario FITC-oveja-anti-conejo (IgG, F-7512, Sigma-Aldrich) 1:150 + NGS 1% durante 90 min en agitación y cámara fría. Se realizaron los lavados correspondientes, luego se incubaron en solución de bloqueo antigénico: NGS 5% + Tritón X-100 0.1% en PBS 0.01 M durante 60 min en agitación y cámara fría. Se retiró la solución de bloqueo y se les adicionó Ac-**anti-TH 1:150** o Ac-**anti-GAD-67 [K-87] 1:800** según correspondiera (+NGS 5% + Tritón X-100 0.1% en PBS 0.01M) incubándolos durante toda la noche en agitación constante, en cámara fría. En el tercer día se realizaron los lavados con PBS 0.01 M y se incubaron los tejidos con Ac-secundario conejo-anti-ratón Cy5 (IgG, 315-176-045, Jackson Immunoresearch) 1:200 + NGS 0,5% en PBS 0.01 M durante 90 min. Luego se realizaron 3 lavados x 5 min con PBS 0.01 M, 1 lavado rápido con H_2O bidestilada y se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados.

2.3.2. B.1.4. IF doble de NEI y TRH-R1

Durante el primer día de incubación, se trabajó sobre una plancha de hielo para la mejor preservación del tejido; se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 0.01 M para luego incubar los segmentos en solución de bloqueo antigénico (suero normal de caballo + 1% Tritón X-100 0.2% + PBS 0.01 M). Luego se retiró la solución de bloqueo y se les agregó Ac-**anti-TRH-R1 1:100** + suero normal de caballo 1% + Tritón X-100 0.2% en PBS 0.01M y se los dejó durante toda la noche en cámara fría y agitación constante. El segundo día se lavaron los tejidos con PBS 0.01 M 3 veces x 5 min y luego se les adicionó el Ac-secundario burro-anti-cabra Alexa-568 (A11057, Invitrogen) 1:200 + suero normal de

caballo 1% durante 90 min en agitación y cámara fría. Se realizaron los lavados correspondientes y luego se incubaron en solución de bloqueo antigénico: Tritón X-100 0.3% + NGS 1% en PBS 0.01 M durante 60 min en agitación y cámara fría. Se retiró la solución de bloqueo y se adicionó Ac-**anti-NEI 1:1000** + NGS 1% + Tritón X-100 0.3% en PBS 0.01M y se los dejó durante toda la noche en cámara fría y agitación constante. El tercer día se realizaron los lavados con PBS 0.01 M y se incubaron los tejidos con Ac-secundario FITC-oveja-anti-conejo (IgG, F-7512, Sigma-Aldrich) 1:150 + NGS 1% durante 90 min. Luego se realizaron 3 lavados x 5 min con PBS 0.01 M, 1 lavado rápido con H₂O bidestilada y se montaron los cortes en portaobjetos gelatinizados.

En **A** y **B** los cortes se dejaron secar al resguardo de la luz y se les colocó el cubreobjetos con ProLong® Gold-DAPI (P36935, Invitrogen) que permite marcar núcleos.

2.3.2. B.1.5. Captura de las imágenes

Se utilizó un microscopio confocal Olympus FV-1000, las áreas seleccionadas fueron ubicadas con el objetivo 20x y luego se realizó la captura de las imágenes con el objetivo 60x de inmersión en el IHy (2 imágenes), la región lateral subincerta de la porción peduncular del hipotálamo lateral (PLHLatSubI) (1 imagen), la PLH (2 imágenes) y el PeF (1 imagen) por cada corte bajo estudio y distribuidas de forma equitativa tanto en los controles como en los tratados. Cuando se trabajó con las IF dobles de NEI-TH y de NEI-GAD-67 se realizó el escaneo del tejido en forma secuencial y lineal, XYZ, siendo el espesor de cada plano z de 1 a 1.3 μ m; el pinhole fue de 110 μ m y se utilizó un Kalman 3. Cuando se trabajó con la IF doble de NEI-TRH-R1 y para las imágenes de ME de todas las IF, la toma de las mismas se realizó sólo en XY. La longitud de onda de emisión (en nm) de los láseres utilizados fueron: DAPI, 461; FITC, 519; Cy5, 664; Alexa-568, 572. Las imágenes obtenidas fueron de 640 x 640 pixels, guardadas como archivos .oib (**Fig. 10**).

2.3.2. B.1.6. Procesamiento de las imágenes-software Image J

2.3.2. B.1.6.1. Densidad óptica (DO)

El total de las imágenes XYZ de los archivos .oib fueron convertidas a .oif y agrupadas utilizando el programa Image J 1.45 (NIH), luego se convirtieron a 8 bits y se realizó la normalización del brillo y del contraste. La inmunoreactividad de NEI, de TH y de GAD-67 fue medida como unidades de DO en los animales control, hipoT e hiperT y la misma fue expresada como valor porcentual relativo (DO relativa) respecto al grupo control.

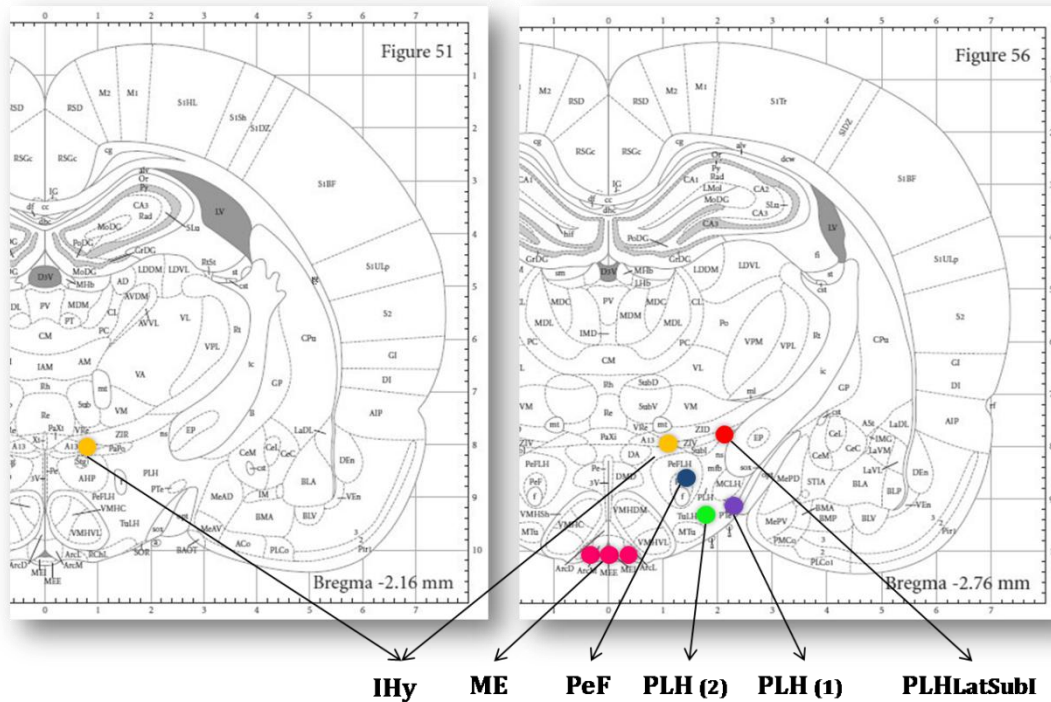


Fig. 10. Representación esquemática de los cortes de cerebro seleccionados para la IF y la localización de las imágenes adquiridas con el microscopio confocal. A la izquierda, imagen a -2.16 mm de distancia al Bregma donde se localiza la porción rostral del área incerto-hipotalámica (IHy); a la derecha, esquema a -2.76 mm del Bregma, de donde se adquirió una imagen del IHy, dos de la porción peduncular del hipotálamo lateral (PLH₍₁₎ y PLH₍₂₎), otra de la región lateral al núcleo subincerto (PLHLatSubI), una del núcleo perifornical (PeF) y tres de la eminencia media (ME). Adaptado del Atlas Paxinos&Watson, 2007 (135).

2.3.2. B.1.6.2. Determinación de la relación NEI-TH y NEI-GAD-67

Para estudiar la relación del soma y las terminales de NEI con la marca de TH y de GAD-67, cada imagen del plano z fue procesada utilizando deconvolución paralela espectral y la correspondiente función de dispersión de punto (PSF) mediante el programa MacBiophotonics Image J 1.43 (NIH). La reconstrucción 3D de las imágenes de IF de NEI y de TH en el IHy y en la PLHLatSubI se realizó con el programa Image J 1.45 (NIH). En el IHy a -2.16 mm del Bregma se analizaron un total de 15 somas NEI-ir y 74 somas TH-ir con las correspondientes terminales, cuantificando el número total de varicosidades TH-ir sobre cada soma NEI-ir y viceversa. En el PLHLatSubI se analizaron un total de 23 somas NEI-ir y el número de varicosidades de TH en contacto con éstos. En ambas áreas se determinó el número de contactos entre las terminales de NEI y TH en el resto de la imagen 3D.

2.3.2. B.1.6.3. Determinación de la colocalización de NEI-GAD-67 y NEI-TRH-R1

Para el análisis de colocalización se utilizaron las imágenes deconvolucionadas y se aplicaron los coeficientes de Manders y Pearson mediante el programa MacBiophotonics Image J 1.43 (NIH).

2.4. Análisis estadístico

Para los resultados obtenidos por RIA el análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de dos vías con el test de Bonferroni como pos-test; cuando los datos no mostraron una distribución normal, los valores fueron transformados logarítmicamente para asegurar la homogeneidad de la varianza. En el caso de los resultados de IHQ e IF los mismos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni. En todos los análisis las diferencias entre medias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. EL HIPO- Y EL HIPERTIROIDISMO AFECTAN LA CONCENTRACIÓN DE NEI EN ÁREAS CEREBRALES DISCRETAS DE RATAS MACHO ADULTAS

(Publicado: Ayala C, Valdez SR, Morero ML, Soaje M, Carreño NB, Sanchez MS, Bittencourt JC, Jahn GA, Celis ME. Hypo- and hyperthyroidism affect NEI concentration in discrete brain areas of adult male rats. *Peptides*. 32(6):1249-54, 2011).

3.1.1. Niveles hormonales circulantes

Los valores de la TSH se vieron modificados en los grupos hipoT e hiperT, encontrándose significativamente elevados en el hipoT tanto en AM como en PM y bajos en los animales hiperT, aunque en este último grupo se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control sólo en AM.

La T₃ y la T₄ circulantes se observaron disminuidas significativamente en el hipoT y aumentadas en el hiperT confirmando nuevamente la efectividad en la inducción de ambos estados. En cuanto a la T₃, en las hipoT no hubo diferencias entre los grupos con inducción corta (7 días) o prolongada (24 días). Respecto a la T₄, se observaron niveles significativamente disminuidos en el grupo hipoT-24 respecto al hipoT-7 y, en el hipoT-7 se encontraron los mayores valores en AM.

Los niveles de la LH se observaron aumentados en el control-PM respecto a AM, pero esta diferencia no fue observada en los animales tratados en los que se encontró una tendencia opuesta.

Los valores de la testosterona no se vieron modificados en ninguno de los grupos estudiados (**Tabla 1**).

3.1.2. Concentración de NEI en el área hipotalámica lateral

En el PLH, la concentración de NEI se mantuvo estable en AM y PM en todos los grupos. No se observaron diferencias entre controles y tratados, mientras que sí hubo cambios cuando se compararon hipoT-7, hipoT-24 e hiperT. Mayor concentración de NEI fue observada en el grupo hipoT-7 respecto al hipoT-24 e hiperT en AM y entre el hipoT-7 y el hipoT-24 en PM (**Fig. 11A**).

En la PeFLH, la concentración de NEI fue similar entre AM y PM en todos los grupos. En el hipoT-24 hubo una reducción marcada del contenido del péptido en ambos horarios respecto a los otros grupos (**Fig. 11B**).

Tabla 1. Valores en suero de TSH, T₃, T₄, LH y T en grupos tratados y controles de ratas macho adultas.

	TSH ng/ml	T3 ng/dl	T4 µg/dl	LH ng/ml	Testosterona ng/ml
control-AM	1.33 ± 0.35	85.3 ± 4.57	3.53 ± 0.16	1.04 ± 0.19 b	0.88 ± 0.35
hipoT-7-AM	7.60 ± 0.61***	22.54 ± 1.18***	1.41 ± 0.31b**	1.68 ± 0.25	1.69 ± 0.31
hipoT-24-AM	ND	23.76 ± 4.00***	0.27 ± 0.11***	ND	1.21 ± 0.36
hiperT-AM	0.20 ± 0.03**	237.50 ± 18.28***	25.24 ± 3.58 ***	1.81 ± 0.25	0.65 ± 0.19
	TSH ng/ml	T3 ng/dl	T4 µg/dl	LH ng/ml	Testosterona ng/ml
control-PM	0.65 ± 0.19	70.2 ± 4.02	3.71 ± 0.28	2.84 ± 0.44a	1.13 ± 0.22
hipoT-7-PM	7.77 ± 0.67***	25.4 ± 2.42***	0.43 ± 0.14a***	1.88 ± 0.44	0.78 ± 0.20
hipoT-24-PM	ND	23.00 ± 2.53***	0.10 ± 0.03***	ND	0.65 ± 0.17
hiperT-PM	0.46 ± 0.12	195.38 ± 23.36***	17.25 ± 2.79***	2.17 ± 0.33	1.08 ± 0.43

Cada valor representa la media ± SEM. ND: no determinado. Las letras representan la comparación de cada grupo analizado en los dos horarios establecidos (AM y PM), "b" indica diferencia significativa respecto de "a": se observan diferencias significativas en los niveles de la T₄ en el hipoT-7-AM vs. hipoT-7-PM, b: p < 0.01; y en los niveles de la LH en el control-AM vs. control-PM, b: p < 0.01. ** Comparación de grupo control vs. tratado en el mismo horario: p < 0.01; *** Comparación del grupo control vs. tratados en el mismo horario: p < 0.001.

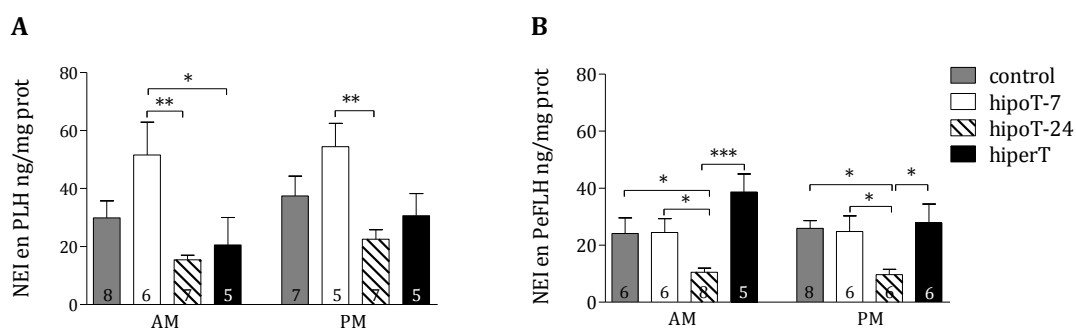


Fig. 11. Concentración de NEI en el área hipotalámica lateral. A. En la región peduncular del hipotálamo lateral (PLH); **B.** en la región perifornical del hipotálamo lateral (PeFLH). Cada columna representa la media ± SEM y en la base de cada una se encuentra el número total de muestras en ese grupo y horario. Los asteriscos (*) representan la comparación entre el grupo control y los tratados: *p < 0.05, **p < 0.01 y ***p < 0.001.

3.1.3. Concentración de NEI en áreas cerebrales relacionadas a reproducción y liberación de hormonas.

En el OVLT + AVPV la concentración de NEI en los animales control fue mayor en AM. En los grupos tratados los niveles de NEI fueron similares entre AM y PM y significativamente menores respecto del control-AM. En PM se observó mayor concentración de NEI en el hipoT-24 respecto del hiperT (**Fig. 12A**).

En el POA, no hubo diferencias entre AM y PM en el control e hipoT; en el hiperT se observó mayor concentración de NEI en AM respecto a PM. En AM, los valores de NEI fueron significativamente mayores en el hiperT respecto al control e hipoT-24 y en el hipoT-7 respecto al control e hipoT-24. En PM, los menores valores observados se encontraron en hipoT-24 respecto del control e hipoT-7 (**Fig. 12B**).

En el Pe, no hubo diferencias significativas entre los grupos.

En la ME + Arc, no se observó diferencia en la concentración de NEI en AM vs. PM. En AM, hubo una disminución en el hipoT-24 respecto del control; en PM, los mayores niveles fueron encontrados en el hipoT-7 e hiperT (**Fig. 12C**).

3.1.4. Concentración de NEI en el núcleo paraventricular hipotalámico

En el PVH no hubo diferencias entre AM y PM. La concentración de NEI se encontró significativamente reducida en el grupo hipoT-24 en ambos horarios (**Fig. 13**).

3.1.5. Concentración de NEI en la neurohipófisis (PP) y glándula pineal (Pi)

En la PP, no hubo diferencias significativas entre los grupos u horarios estudiados (**Fig. 14A**).

En la Pi, la concentración de NEI fue similar entre el control-AM y el control-PM. Sin embargo, en los animales hipotiroideos se observaron tendencias opuestas en los valores de NEI entre AM y PM, viéndose reducidos en el hipoT-7-PM y aumentados en el hipoT-24-PM. Cuando comparamos los distintos grupos en AM, la concentración de NEI fue mayor en el hipoT-7 respecto al hipoT-24; mientras que en PM los valores de NEI fueron mayores en el hiperT respecto al hipoT-7 y al control y en el hipoT-24 respecto al hipoT-7 (**Fig. 14B**).

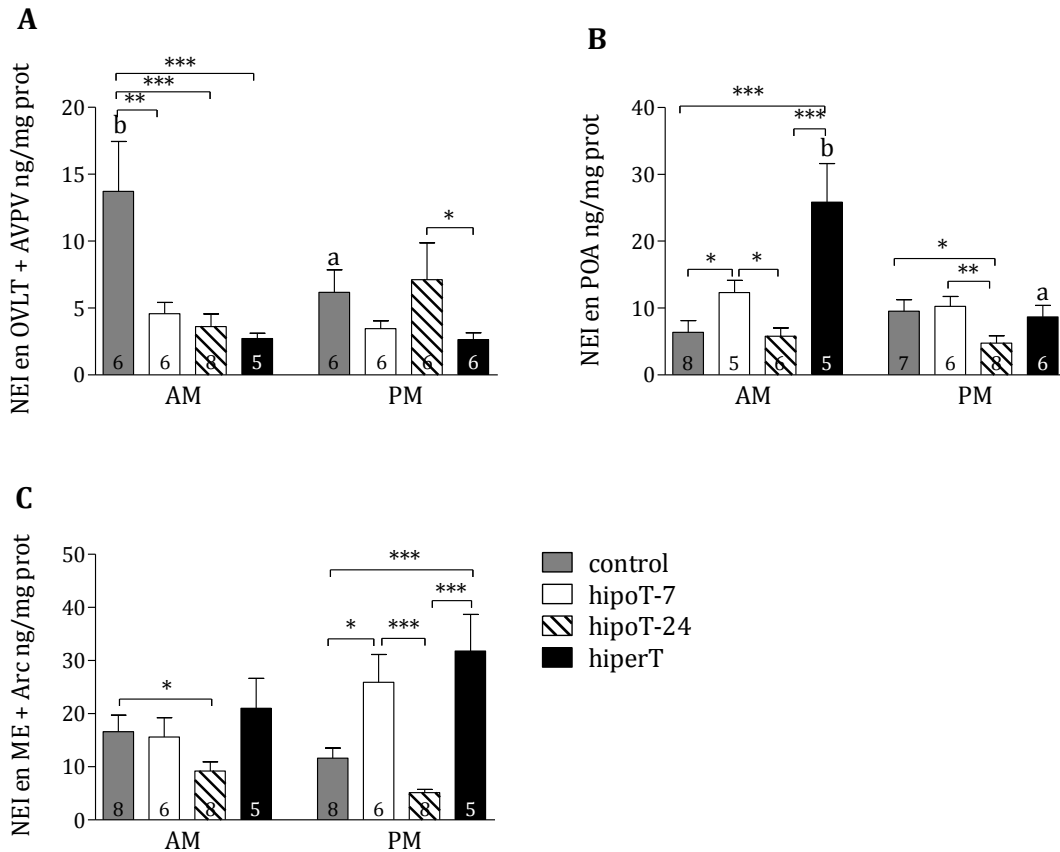


Fig. 12. Concentración de NEI en áreas cerebrales relacionadas a la reproducción y la liberación hormonal, con presencia conocida de fibras de NEI. A. En el órgano vascular de la lámina terminal + núcleo antero-ventroperiventricular (OVL + AVPV); **B.** en el área preóptica (POA); **C.** en la eminencia media + núcleo arcuato (ME + Arc). Cada columna representa la media \pm SEM y en la base de cada una se encuentra el número total de muestras en ese grupo y horario. Los asteriscos (*) representan la comparación entre el grupo control y los tratados: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. Las letras representan la comparación de cada grupo bajo estudio con sí mismo en uno y otro horario: en **A.** b: $p < 0.05$; en **B.** b: $p < 0.01$.

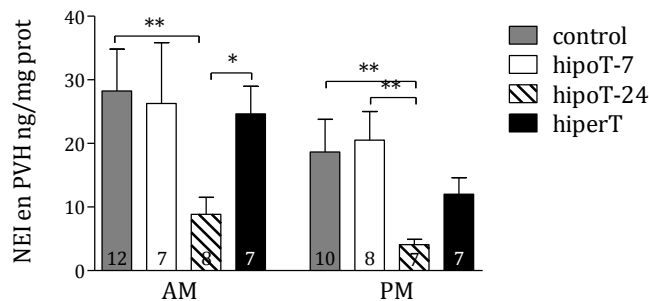


Fig. 13. Concentración de NEI en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVH). Cada columna representa la media \pm SEM y en la base de cada una se encuentra el número total de muestras en ese grupo y horario. Los asteriscos (*) representan la comparación entre el grupo control y los tratados: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

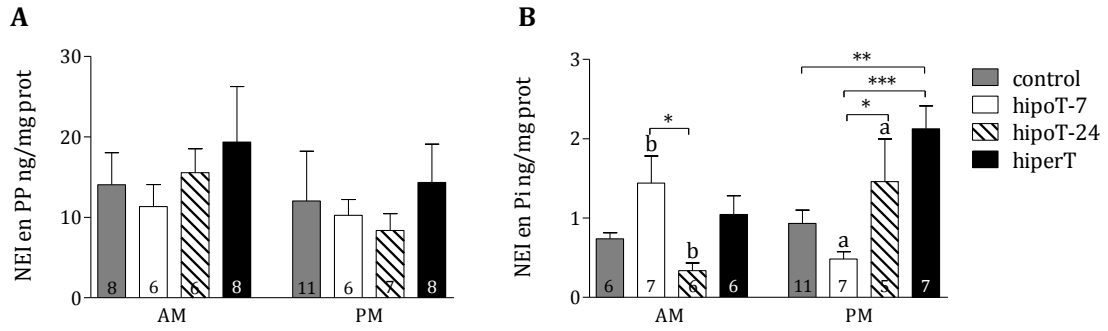


Fig. 14. Concentración de NEI en la PP (A) y en la Pi (B). Cada columna representa la media \pm SEM y en la base de cada una se encuentra el número total de muestras en ese grupo y horario. Los asteriscos (*) representan la comparación entre el grupo control y los tratados: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Las letras representan la comparación de cada grupo bajo estudio con sí mismo en uno y otro horario: b: $p < 0.05$.

3.2. MODIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NEI SECUNDARIO A LA INDUCCIÓN DEL HIPO- E HIPERTIROIDISMO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA RATA

3.2.1. Niveles hormonales circulantes

Como era de esperar, los niveles de la LH se observaron significativamente aumentados en el control-P-PM respecto al resto del ciclo (**Fig. 15A**). El hipoT-P-PM presentó un aumento en los niveles de la LH respecto al hipoT-E-AM (**Fig. 15B**), mientras que no se observaron diferencias en el grupo hiperT (**Fig. 15C**). Tanto el hipo- como el hiperT inhibieron el aumento de la LH observado en el grupo control (**Fig. 15D**).

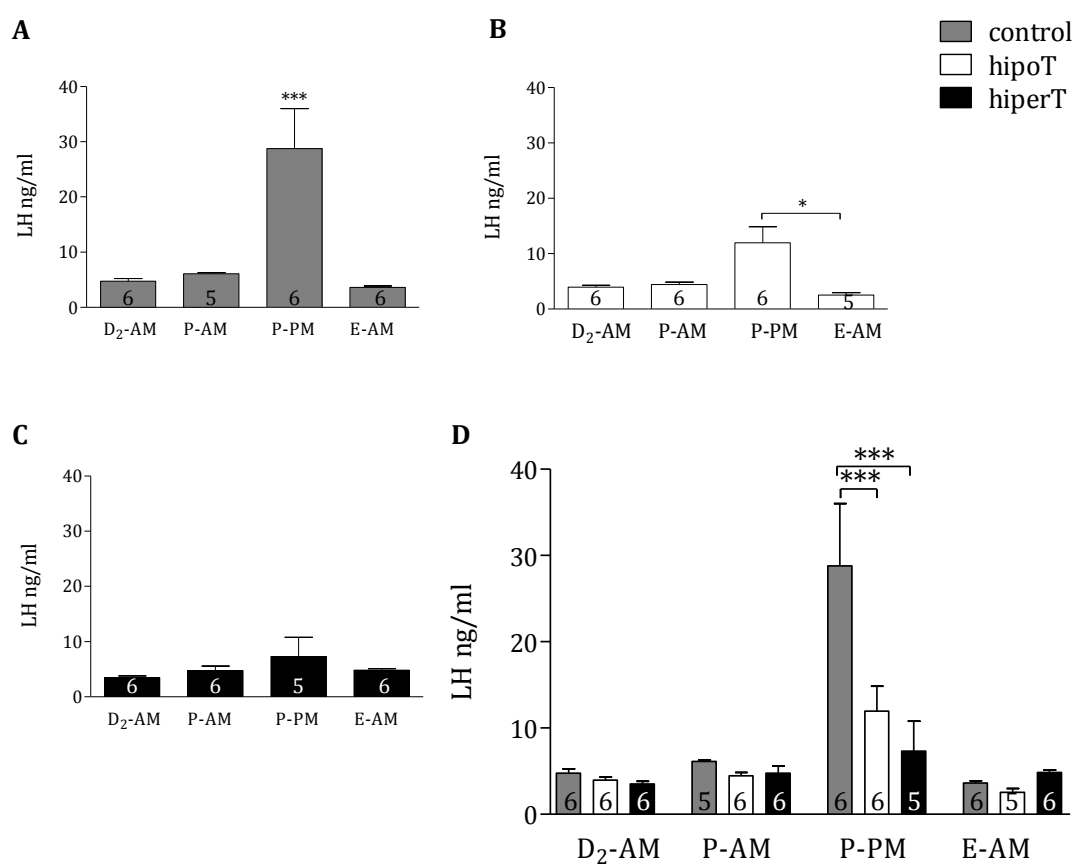


Fig. 15. Niveles séricos de la LH durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; B. en el grupo hipoT; C. en el grupo hiperT. D. Comparación de los niveles circulantes de la LH durante el ciclo en todos los grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Los niveles del estradiol fueron los esperados, siendo mayores en el control-P-AM respecto al resto del ciclo (**Fig. 16A**). En el hipoT se observaron mayores niveles en el P-PM (**Fig. 16B**), mientras que en el grupo hiperT los valores fueron significativamente mayores en el P-AM y en el P-PM respecto a los otros momentos del ciclo (**Fig. 16C**). Al comparar todos los grupos se observó un comportamiento opuesto entre el control y el hipoT en el P. No se encontraron diferencias entre el control y el hiperT a lo largo del ciclo (**Fig. 16D**).

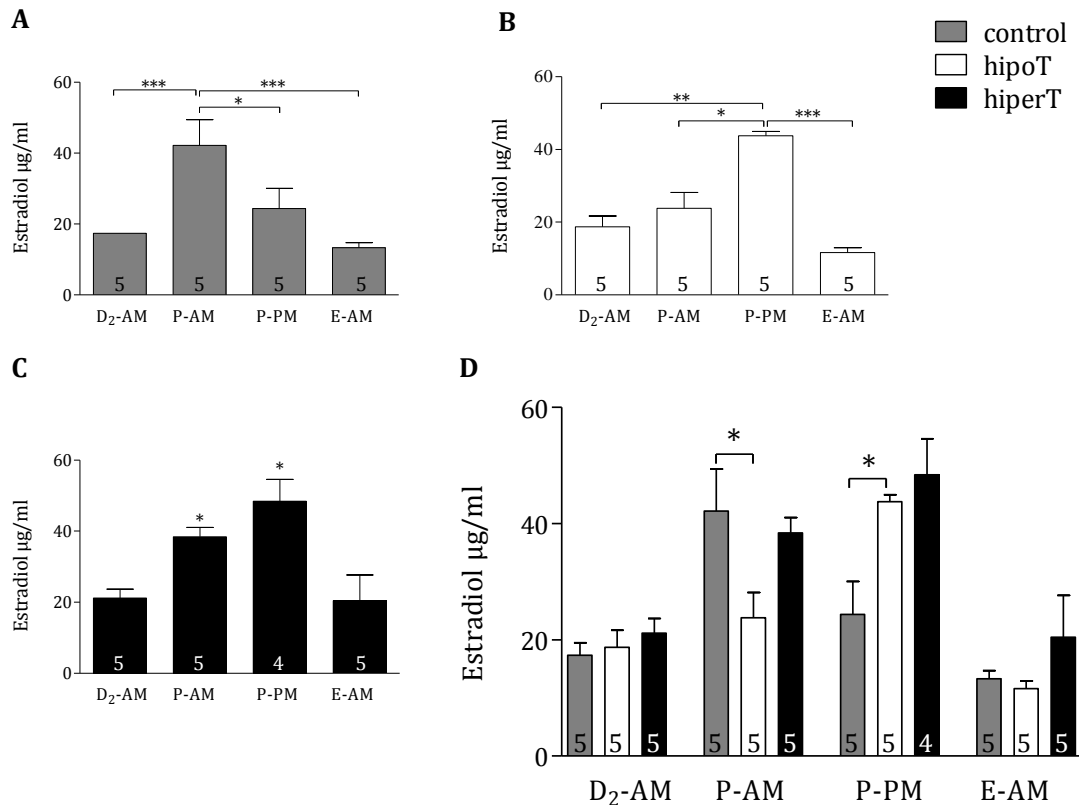


Fig. 16. Niveles séricos del estradiol durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; **B.** en el grupo hipoT; **C.** en el grupo hiperT. **D.** Comparación de los valores del estradiol a lo largo del ciclo estral en todos los grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En el grupo control los niveles de progesterona fueron mayores en el P-PM respecto al resto del ciclo (**Fig. 17A**); en el hipoT (**Fig. 17B**) y en el hiperT (**Fig. 17C**) se observó también un aumento en el P-PM, siendo significativo respecto al hipoT-D₂-AM y al hiperT-E-AM, respectivamente. Cuando se compararon todos los grupos, un patrón diferente fue observado en el hiperT-D₂-AM donde los niveles de progesterona fueron mayores respecto a los otros tratamientos (**Fig. 17D**).

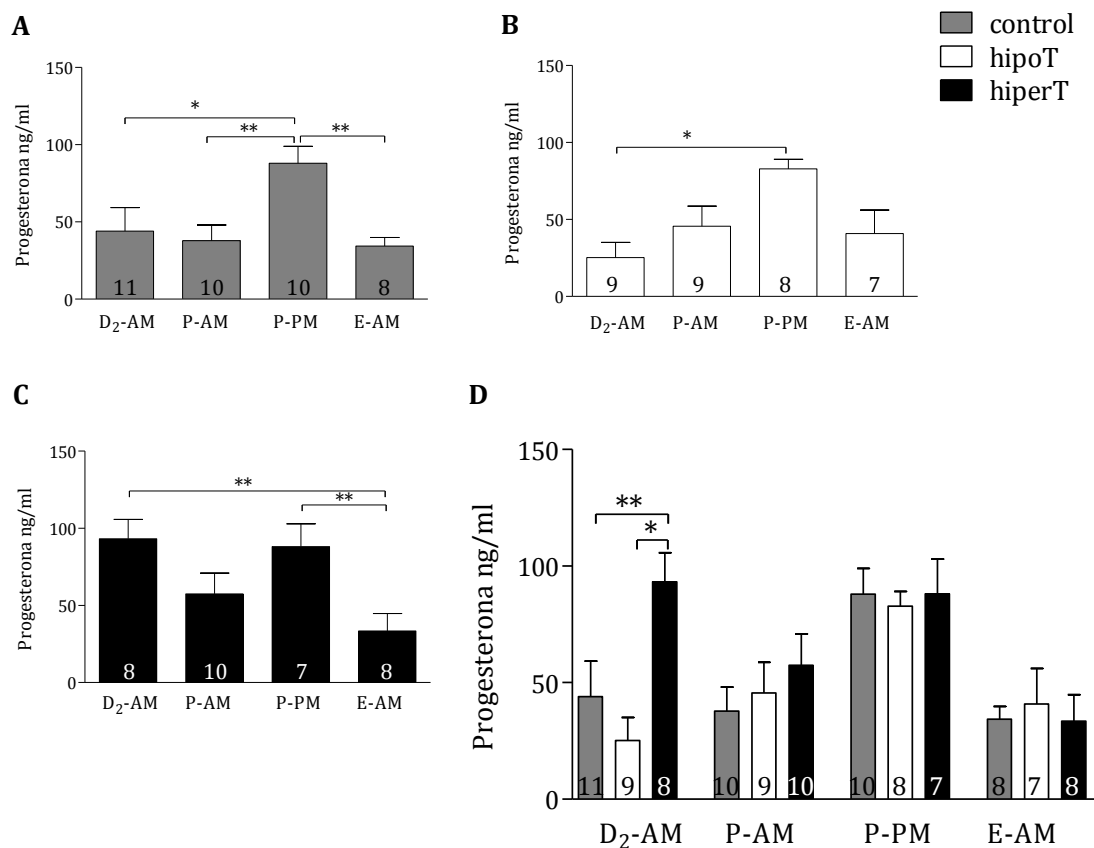


Fig. 17. Niveles circulantes de la progesterona durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. *A.* En el grupo control; *B.* en el grupo hipoT; *C.* en el grupo hiperT. *D.* Comparación de los valores de la progesterona a lo largo del ciclo estral en todos los grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Para validar el modelo de hipo- e hipertiroidismo, se determinaron los niveles circulantes de la TSH (ng/ml) durante el ciclo en todos los grupos; en el control se observaron mayores niveles de la TSH en el D₂-AM respecto al P-AM, en el hipoT se observaron mayores niveles de la TSH en el P-AM y PM y en el hiperT los mayores niveles se observaron en D₂-AM y en el E-AM. Cuando se compararon todos los grupos se halló el aumento esperado en el hipoT y los menores valores se encontraron en hiperT P-AM y PM (**Tabla 2**). Además, en el P-AM se determinaron la T₃ y la T₄, siendo los valores significativamente diferentes entre el control y los tratados (**Tabla 3**).

Tabla 2. Valores en suero de la TSH en los grupos tratados y control de ratas hembra adultas durante el ciclo estral.

Grupo	TSH ng/ml			
	D ₂ -AM	P-AM	P-PM	E-AM
control	2.35 ± 0.15b	3.51 ± 0.26a	3.00 ± 0.10	2,74 ± 0,18
hipoT	9.70 ± 0.40b***	12.90 ± 0.41a***	11.17 ± 0.34a***	7,68 ± 0,62ba***
hiperT	2.25 ± 0.18b	1.75 ± 0.04a***	1.81 ± 0.06a***	2,23 ± 0,07b

Cada valor representa la media ± SEM. El asterisco (*) representa la comparación entre control y tratados en el mismo momento/día del ciclo: *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. La letra "b" indica diferencia significativa respecto de "a"; se observan diferencias significativas en los valores de la TSH en el control-D₂-AM vs. control-P-AM, b: p < 0.01; en el hipoT-D₂-AM vs. hipoT-E-AM, b: p < 0.05; en el hipoT-D₂-AM vs. hipoT-P-AM e hipoT-P-PM, b: p < 0.001; en el hipoT-P-PM vs. hipoT-E-AM, b: p < 0.001; en el hiperT-P-AM vs. hiperT-D₂-AM e hiperT-E-AM, b: p < 0.01; en el hiperT-P-PM vs. hiperT-D₂-AM e hiperT-E-AM, b: p < 0.05.

Tabla 3. Valores circulantes de T₃ y T₄ en el P-AM en el grupo control y tratados.

Grupo	T ₃ ng/dl	T ₄ µg/dl
control-P-AM	127.70 ± 21.12	4.09 ± 0.76
hipoT-P-AM	34.19 ± 8.29***	0.85 ± 0.39**
hiperT-P-AM	273.60 ± 34.38*	75.63 ± 4.23***

Cada valor representa la media ± SEM. El asterisco (*) representa la comparación entre control y tratados en el mismo momento/día del ciclo: *p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001; se observan diferencias significativas en los valores de la T₃ en el control-P-AM vs. hipoT-P-AM *** p < 0.001 y en el control-P-AM vs. hiperT-T-P-AM * p < 0.05; y en la T₄ en el control-P-AM vs. hipoT-P-AM ** p < 0.01 y vs. hiperT-P-AM *** p < 0.001.

3.2.2. Concentración de NEI en áreas hipotalámicas relacionadas con la síntesis del péptido

En el IHy la concentración de NEI se mantuvo estable en los grupos control (**Fig. 18A**) hipoT (**Fig. 18B**), mientras que en el hiperT se observó una disminución en el E-AM comparado con los otros momentos del ciclo (**Fig. 18C**). Cuando se compara el grupo control con los grupos experimentales, los valores más altos de NEI se encontraron en el hiperT-P-AM y en ambos grupos tratados en comparación con el control en D₂ (**Fig. 18D**).

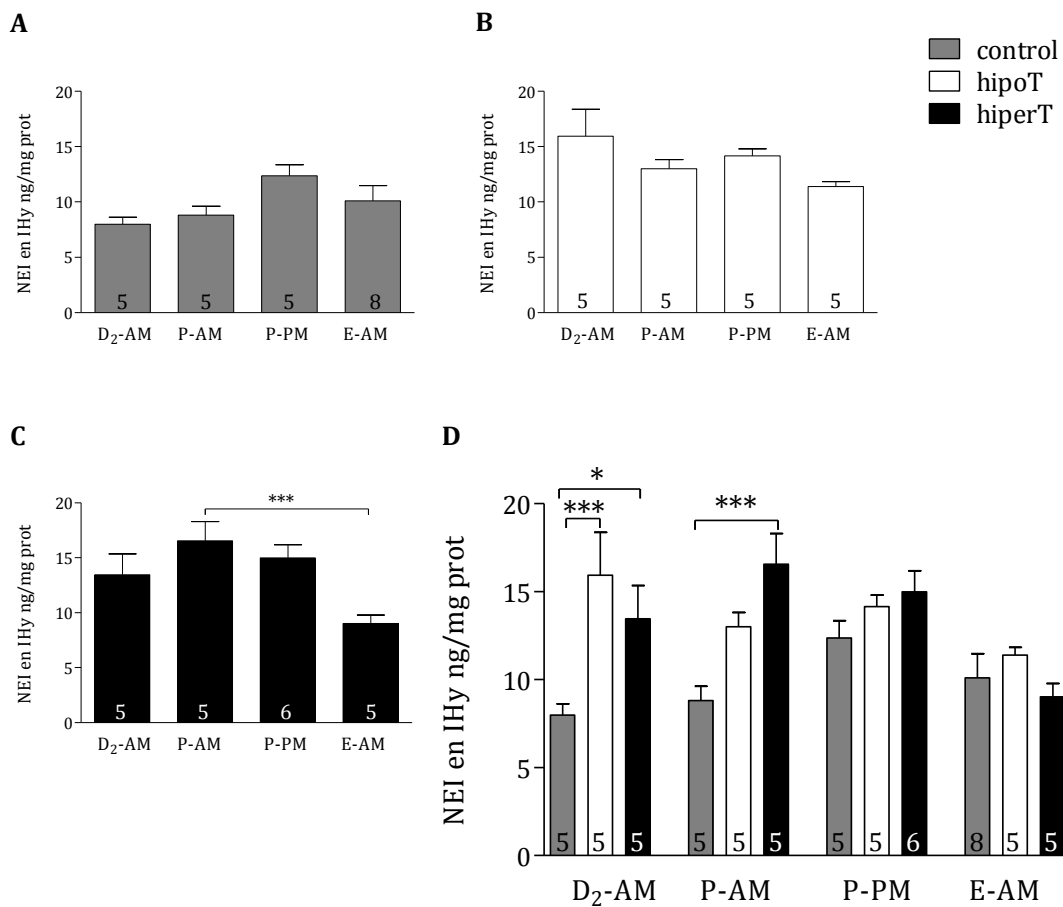


Fig. 18. Concentración de NEI en el área incerto-hipotalámica (IH) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; B. en el grupo hipoT; C. en el grupo hiperT. D. Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

En el PLH la concentración de NEI se mantuvo constante a lo largo del ciclo en el control (**Fig. 19A**) y en el hiperT (**Fig. 19C**), mientras que en el hipoT se observó una reducción en el contenido de NEI en el D₂-AM respecto al E-AM (**Fig. 19B**). Cuando se compararon los tres grupos, los menores niveles de NEI se observaron en el grupo hipoT durante todo el ciclo excepto en el E-AM donde fueron similares en todos los grupos (**Fig. 19D**).

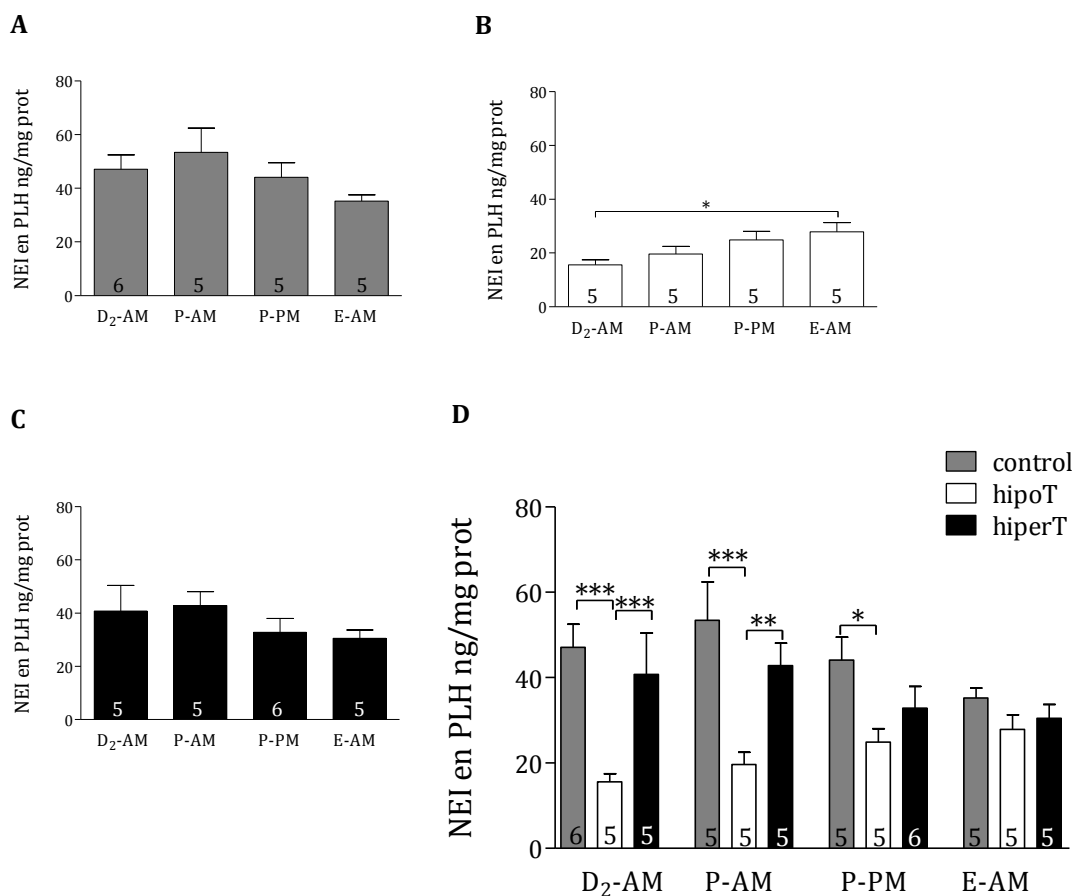


Fig. 19. Concentración de NEI en la región peduncular del hipotálamo lateral (PLH) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; B. en el grupo hipoT; C. en el grupo hiperT. D. Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

En la PeFLH se observaron cambios en la concentración de NEI en todos los grupos. En el control la mayor concentración del péptido fue hallada en el P-PM respecto del P-AM y del E-AM (**Fig. 20A**). En el grupo hipoT un incremento en la concentración de NEI se observó en el E-AM respecto a los demás días del ciclo (**Fig. 20B**). En el hiperT, se observó una disminución en el contenido de NEI en el P-PM (**Fig. 20C**). Comparando todos los grupos, los niveles de NEI se incrementaron en el hiperT-P-AM y en el control-P-PM. En el E-AM la concentración del péptido fue mayor en los grupos experimentales respecto al grupo control. En el D₂-AM no se encontraron diferencias entre control y tratados, pero sí entre el hipoT y el hiperT (**Fig. 20D**).

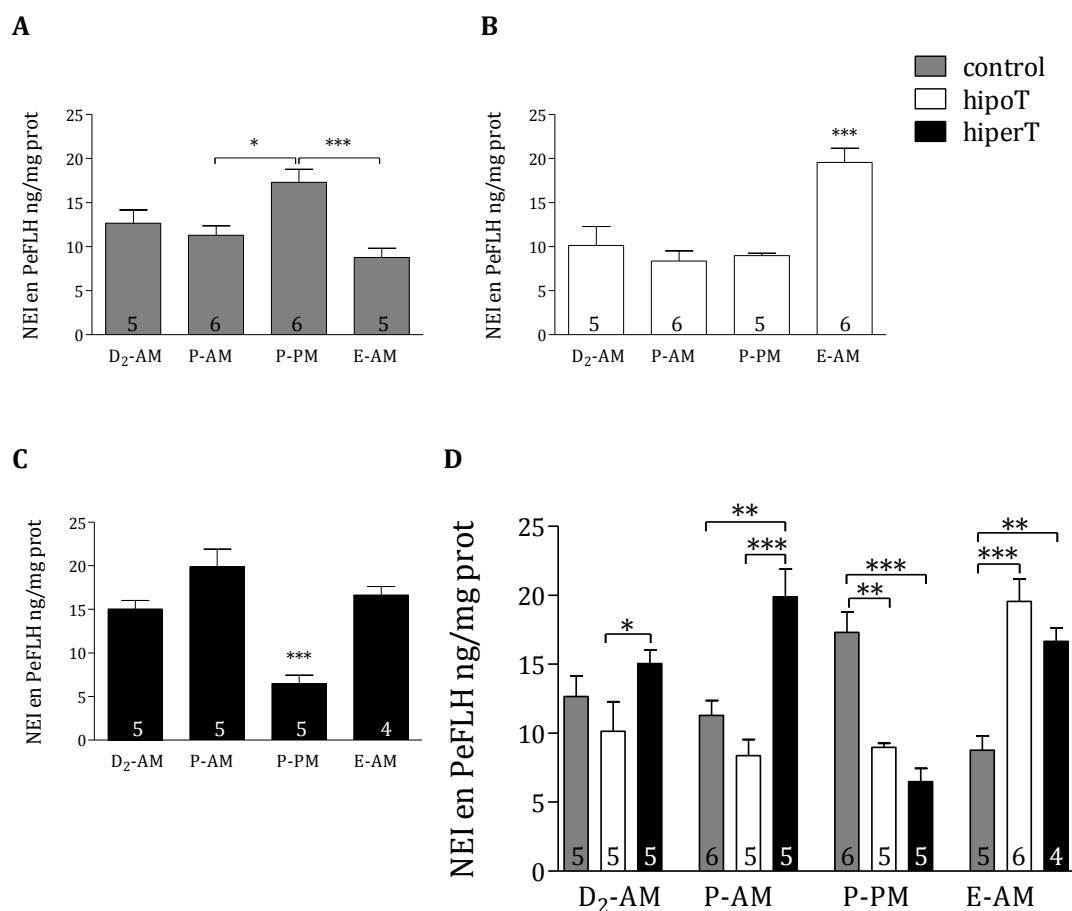


Fig. 20. Concentración de NEI la región perifornical del hipotálamo lateral (PeFLH) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. **A.** En el grupo control; **B.** en el grupo hipoT; **C.** en el grupo hiperT. **D.** Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.2.3. Concentración de NEI en áreas con presencia conocida de fibras NEI-ir y que participan en la regulación de la fisiología reproductiva

En el OVLT + AVPV los niveles de NEI disminuyeron en el control-P-PM en relación al P-AM y al D₂-AM (**Fig. 21A**). No se observaron diferencias en los grupos experimentales a lo largo del ciclo (**Fig. 21B** y **21C**, para el hipoT y el hiperT respectivamente). Cuando se compararon el control y los tratados, en el hipoT-P-PM se observó mayor concentración NEI respecto del control (**Fig. 21D**).

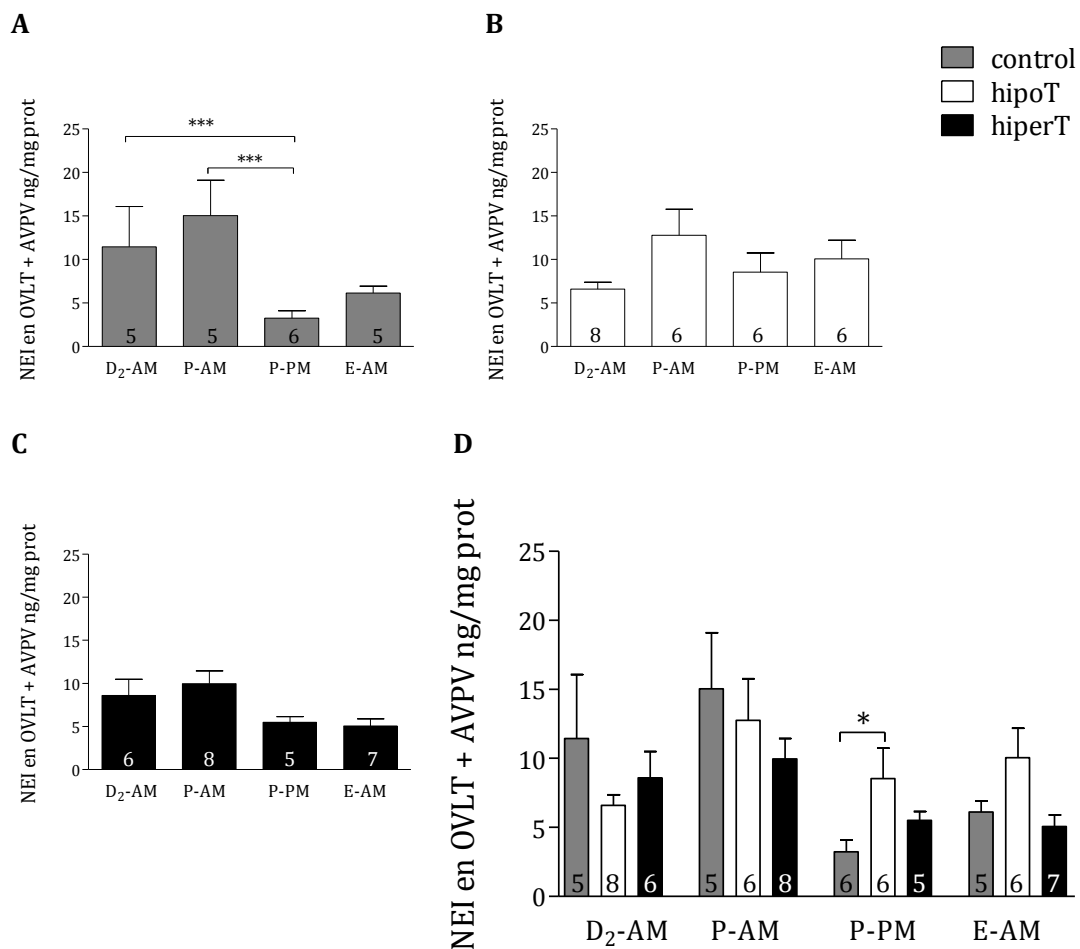


Fig. 21. Concentración de NEI en el órgano vasculoso de la lámina terminal y en el núcleo antero-ventroperiventricular (OVL + AVPV) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. **A.** En el grupo control; **B.** en el grupo hipoT; **C.** en el grupo hiperT. **D.** Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

En el POA, la concentración de NEI se mantuvo estable a lo largo del ciclo en los grupos control (**Fig. 22A**) e hiperT (**Fig. 22C**); mientras que en el hipoT se observó una disminución en el P-PM respecto del P-AM y del E-AM y en el hipoT-D₂-AM respecto al hipoT-P-AM (**Fig. 22B**). Cuando se realizó la comparación de todos los grupos a lo largo del ciclo, en el hiperT-D₂-AM los valores de NEI fueron mayores respecto de los otros dos grupos (**Fig. 22D**).

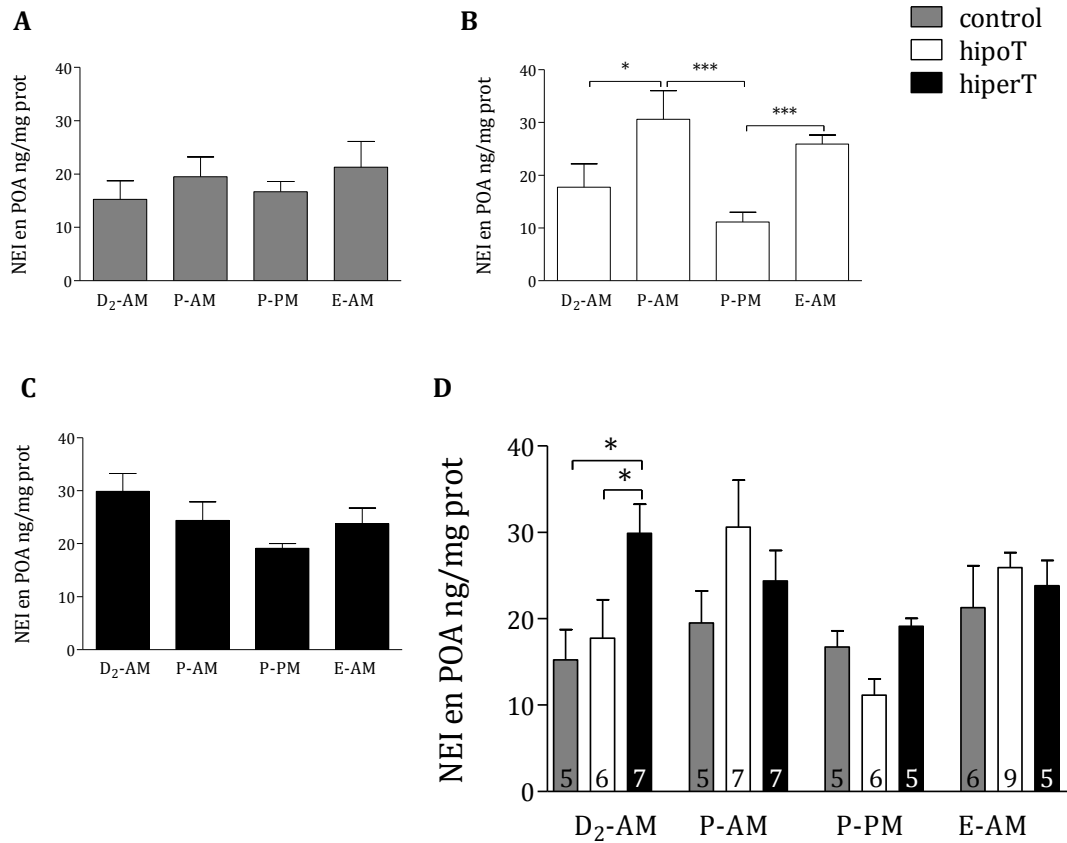


Fig. 22. Concentración de NEI en el área preóptica (POA) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; **B.** en el grupo hipoT; **C.** en el grupo hiperT. **D.** Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

En el Pe, los niveles de NEI no se modificaron a lo largo del ciclo en el grupo control (**Fig. 23A**) ni en el hiperT (**Fig. 23B**); mientras que se observó un aumento en el hipoT-E-AM respecto del P-PM (**Fig. 23C**), en este mismo grupo mayor concentración de NEI se encontró en el E-AM respecto a los controles cuando se compararon todos los grupos estudiados (**Fig. 23D**).

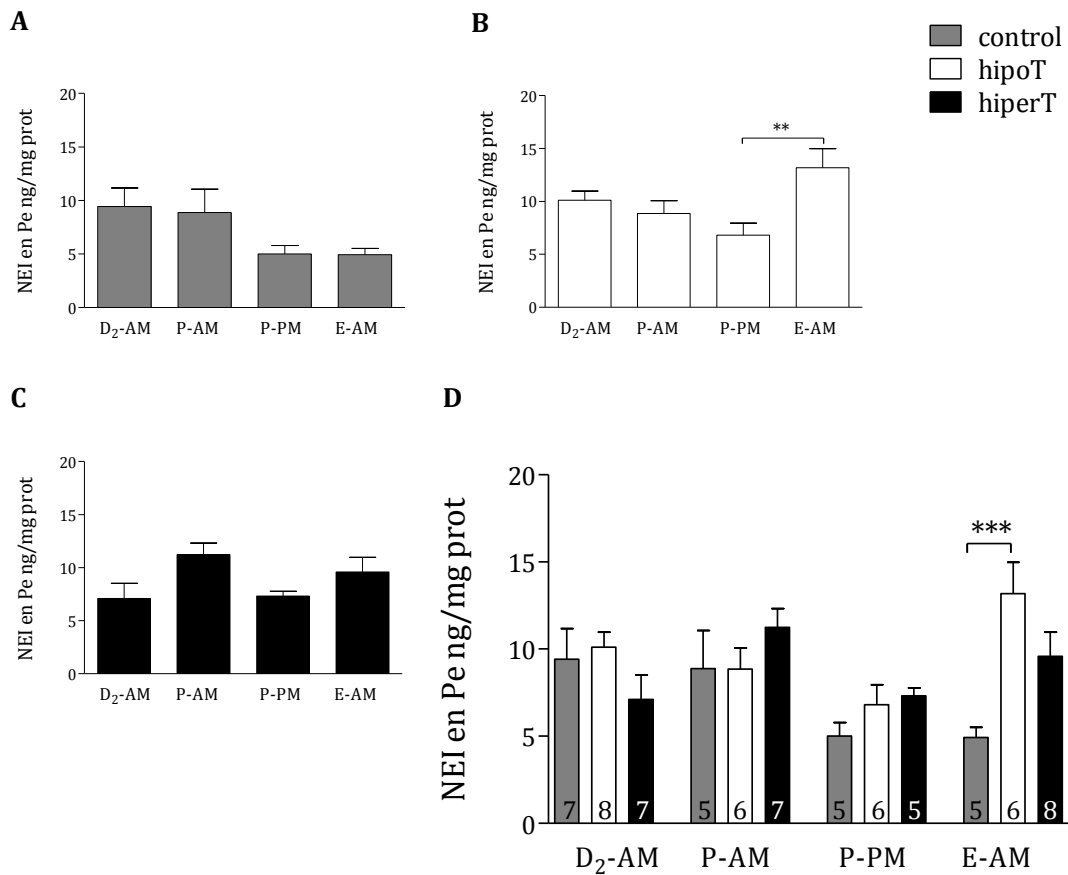


Fig. 23. Concentración de NEI en el núcleo periventricular (Pe) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; **B.** en el grupo hipoT; **C.** en el grupo hiperT. **D.** Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En el PVH los niveles de NEI se mantuvieron constantes a lo largo del ciclo. Cuando comparamos todos los grupos se observó mayor concentración del péptido en el hipoT-E respecto del control en ese mismo momento del ciclo (**Fig. 24**).

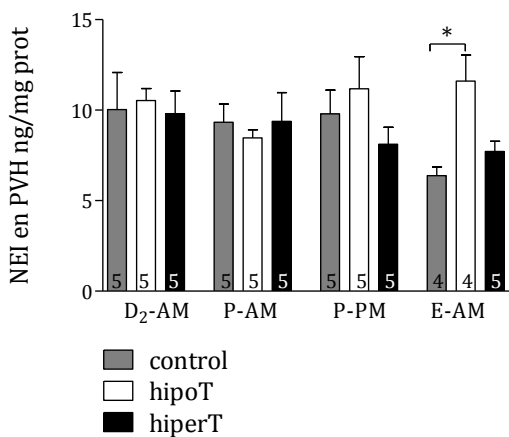


Fig. 24. Concentración de NEI en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVH) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados; cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras se especifica en la base de cada barra: * $p < 0.05$.

En la ME + Arc, en el control y en el hipoT se observó aumento de la concentración de NEI en el E-AM (**Fig. 25A y B**), mientras que en el hiperT no se observaron diferencias significativas (**Fig. 25C**). Cuando se compararon los distintos grupos a lo largo del ciclo, la mayor concentración de NEI fue encontrada en el hiperT-P-AM respecto del hipoT-P-AM, en el hiperT-P-PM respecto del control-P-PM y en el control e hipoT-E-AM respecto del hiperT (**Fig. 25D**).

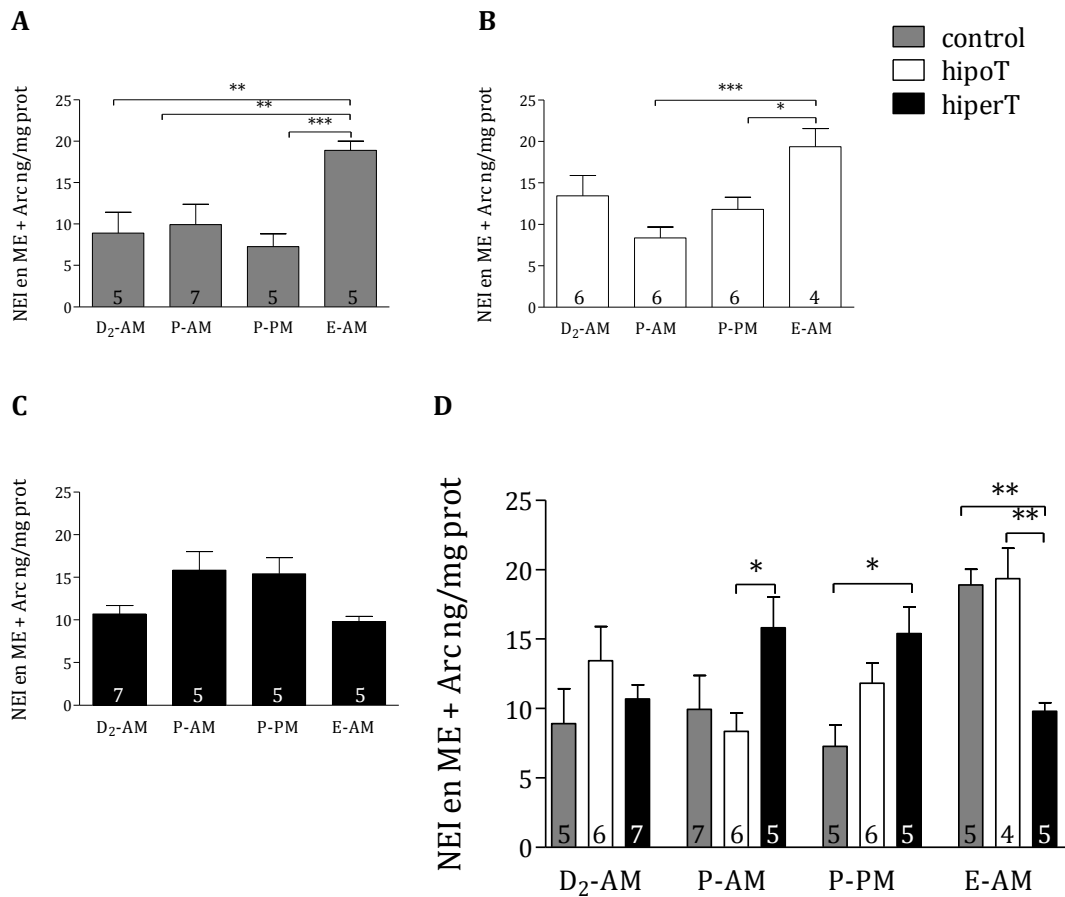


Fig. 25. Concentración de NEI en la eminencia media y en el núcleo arcuato (ME + Arc) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; B. en el grupo hipoT; C. en el grupo hiperT. D. Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$.**

3.2.4. Concentración de NEI en la neurohipófisis

En la PP, en el grupo control se observó mayor concentración de NEI en el P-AM respecto al D₂-AM y al P-PM y en el E-AM respecto al control-P-PM y control-D₂-AM (**Fig. 26A**). No se observaron cambios en el grupo hipoT (**Fig. 26B**), mientras que en el hiperT se observaron niveles más altos de NEI en el D₂-AM (**Fig. 26C**). Cuando comparamos los distintos grupos a lo largo del ciclo se observó que la concentración de NEI fue mayor en los grupos control e hipoT, a excepción del D₂-AM donde no se observaron diferencias (**Fig. 26D**).

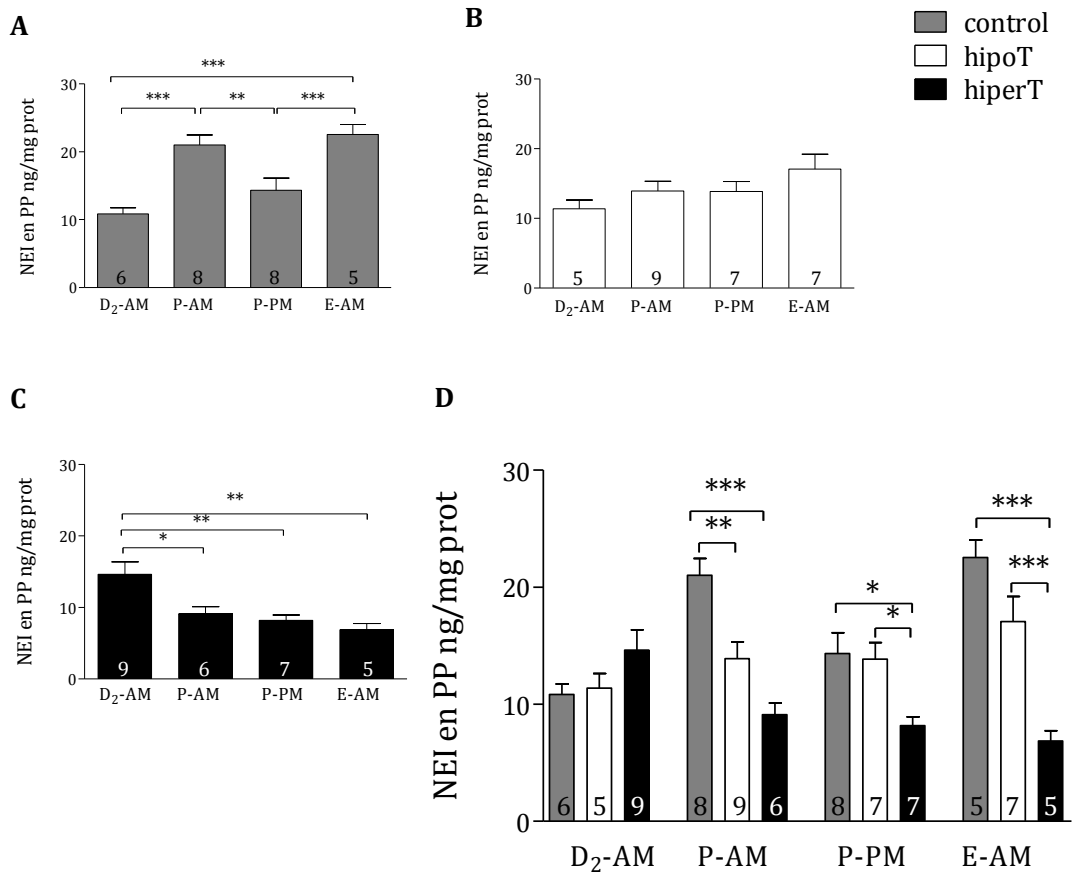


Fig. 26. Concentración de NEI en la neurohipófisis (PP) durante el ciclo estral en los distintos grupos estudiados. A. En el grupo control; **B.** en el grupo hipoT; **C.** en el grupo hiperT. **D.** Comparación del contenido de NEI a lo largo del ciclo en los distintos grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM, el número total de muestras para ese grupo se detalla en la base de cada barra: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3.3. A. EL HIPERTIROIDISMO AUMENTA LAS TERMINACIONES NERVIOSAS DEPENDIENTES DE NEI

3.3. A.1. Cuantificación del número de partículas NEI-ir en el MPA y el LPO

El MPA y el LPO constituyen el POA. La intensidad máxima de los puntos NEI-ir fue cuantificada observándose un aumento en el número de puntas NEI-ir en el grupo hiperT respecto al control y al hipoT (Fig. 27).

3.3. A.2. Cuantificación del número total de somas NEI-ir en el hipotálamo desde -2.16 a -2.92 mm del Bregma

Del total de cortes incubados comprendidos entre las distancias -1.92 a -2.92 mm respecto al Bregma se cuantificaron el número total de somas NEI-ir, no hallándose diferencias entre los distintos grupos.

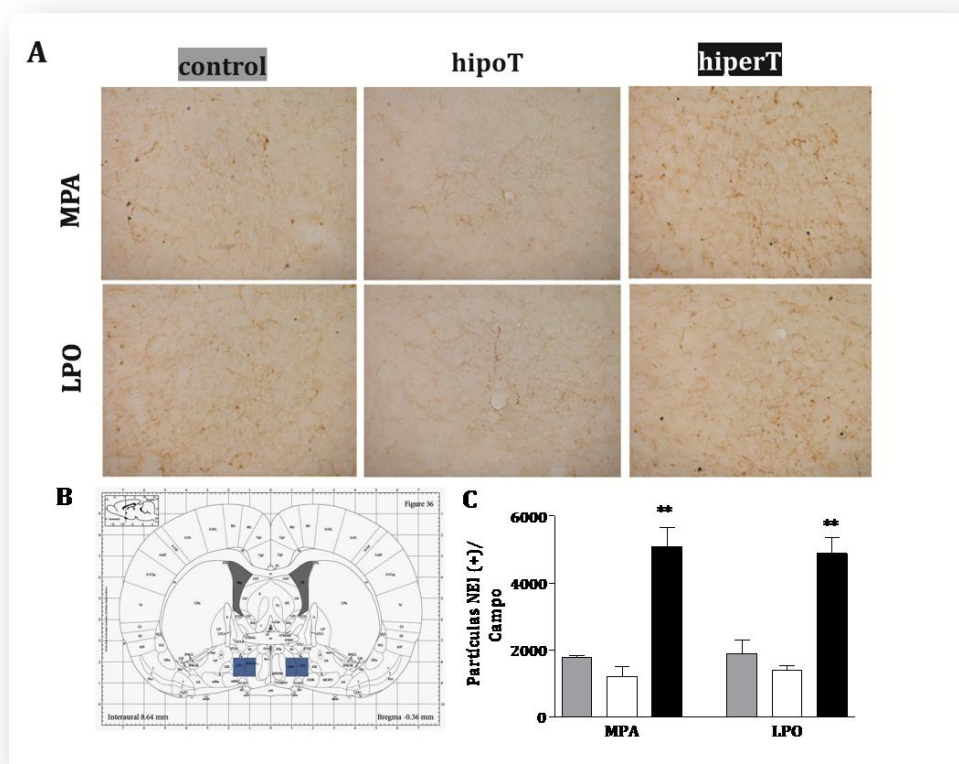


Fig. 27. El hiperT induce un aumento del número de puntas NEI-ir en el área preóptica medial (MPA) y lateral (LPO). **A.** Imagen obtenida por microscopía de luz (40x) a -0.36 mm del Bregma, se observan fibras NEI-ir en el MPA y en el LPO de animales control, hipoT e hiperT; **B.** representación esquemática de un corte coronal del cerebro de rata a -0.36 mm del Bregma, se señalan en los recuadros en azul las zonas de donde se adquirieron las imágenes; **C.** cuantificación de las puntas NEI-ir a -0.36 mm del Bregma demostrándose el aumento significativo del número de partículas (puntas) NEI-ir en el hiperT en ambas regiones del área preóptica (POA). Las barras representan la media \pm SEM: ** $p < 0.01$.

3.3. B. EL HIPO- Y EL HIPERTIROIDISMO MODIFICAN LA EXPRESIÓN DE NEI Y DE LA TH EN DISTINTAS ÁREAS HIPOTALÁMICAS DE RATAS MACHO ADULTAS

3.3. B.1. Área incerto-hipotalámica (IHy)

El IHy comprende una región caracterizada por la presencia de somas y fibras que expresan TH y neuronas que sintetizan NEI. Se localiza entre el hipotálamo medial y la ZI en el eje rostro caudal del cerebro. Las imágenes analizadas fueron adquiridas a dos distancias del Bregma, una rostral (aproximadamente entre -1.92 y -2.16 mm) y otra caudal (aproximadamente a -2.76 mm).

3.3. B.1.1. Características de la expresión de NEI y de la TH en el IHy rostral

En esta región se observó una estrecha relación entre los somas y las fibras que el péptido con los somas y las fibras TH-ir en todos los grupos estudiados (**Fig. 28**).

3.3. B.1.1.1. Cuantificación de la expresión de NEI y TH en el IHy rostral

Se observó un aumento en la expresión de NEI en el hipoT respecto al control, mientras que no hubo modificaciones en la expresión de TH (**Fig. 29**).

3.3. B.1.1.2. Evidencia de la interacción de los somas y varicosidades de NEI con los somas y terminales TH-ir

Si bien la imagen de IF del IHy a -2.16 mm del Bregma sugiere una estrecha relación entre los somas y terminales NEI-ir con aquellos que expresan TH, la reconstrucción tridimensional (3D) permitió confirmar la misma. A modo de ejemplo se muestra la correspondiente a un animal control (**Fig. 30**).

3.3. B.1.1.3. Cuantificación de los puntos de contacto de NEI y TH

La cuantificación de los puntos de contacto en todos los grupos estudiados fue realizada en las imágenes de reconstrucción 3D, pudiendo determinar que en el hipoT no se modifica el número de varicosidades de NEI sobre los somas TH-ir, mientras que en el hiperT se reduce su número (**Fig. 31A**); el efecto opuesto se observó en el número de terminales de TH sobre los somas NEI-ir (**Fig. 31B**). El número total de interacciones entre las varicosidades y terminales de NEI y de TH se observaron disminuidas en el grupo hiperT (**Fig. 31C**).

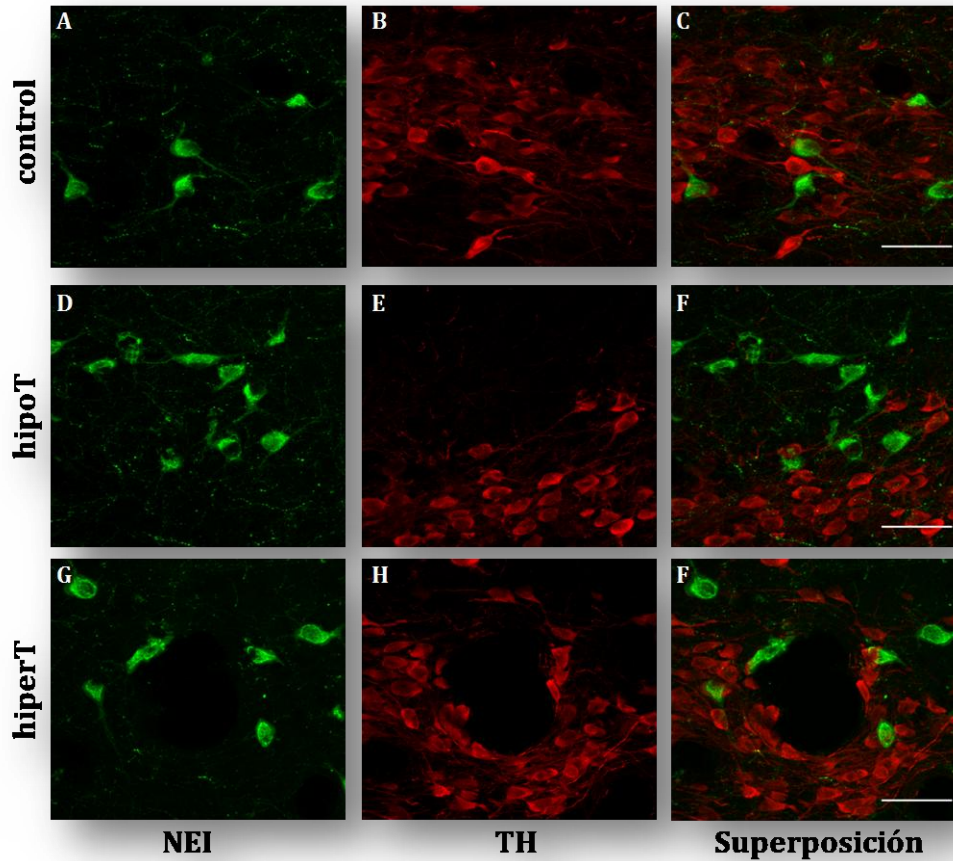


Fig. 28. Inmunofluorescencia de NEI (verde) y de TH (rojo) en el área incerto-hipotalámica (IHy) rostral en los grupos control, hipoT e hiperT. Se observó una estrecha relación entre las marcas de NEI y la de TH en todos los grupos estudiados. Caracterización de la expresión del neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina amida (NEI: fluorescencia verde en A, D y G; marcado con FITC) y de tirosina hidroxilasa (TH: fluorescencia roja en B, E y H; marcado con Cy5) en los grupos control: A-C, hipoT: D-F e hiperT: G-I. En C, F e I se muestra la superposición de los canales verde y rojo. Barra de escala: 50 μ m.

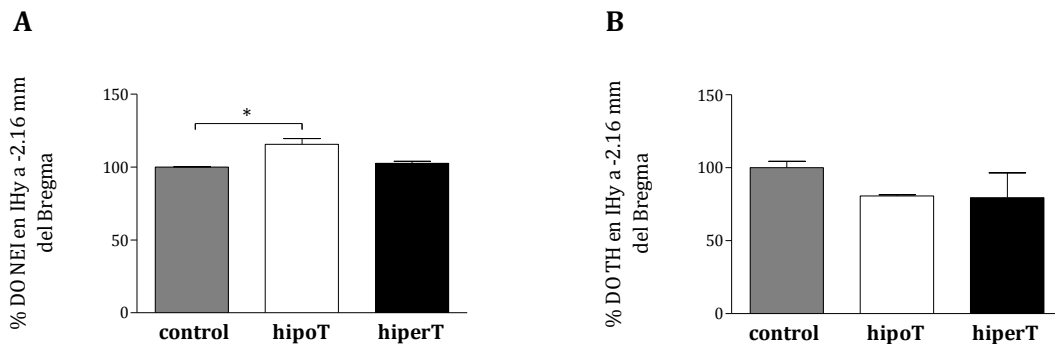


Fig. 29. Cuantificación de la Densidad óptica (DO) relativa de NEI (A) y de TH (B) en el área incerto-hipotalámica (IHy) rostral. El hipoT induce un aumento en la expresión de NEI en el IHy rostral. Cada columna representa la media \pm SEM: * $p < 0.05$.

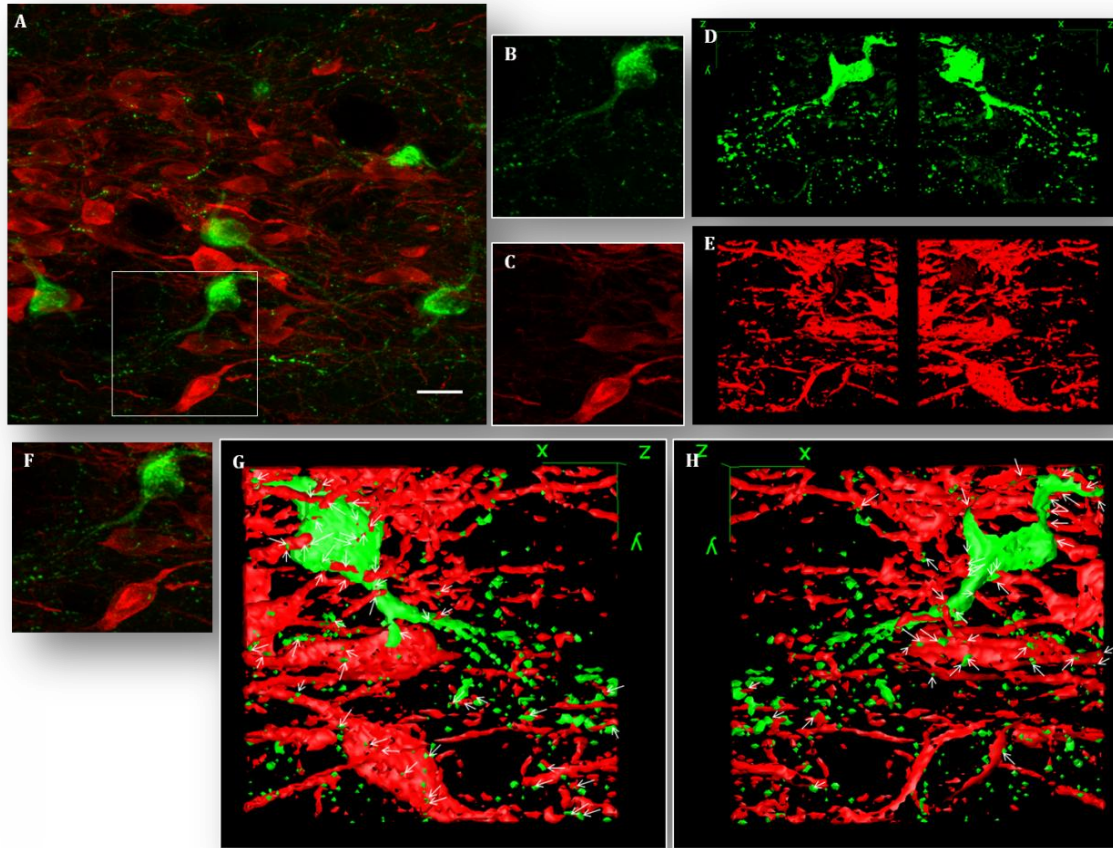
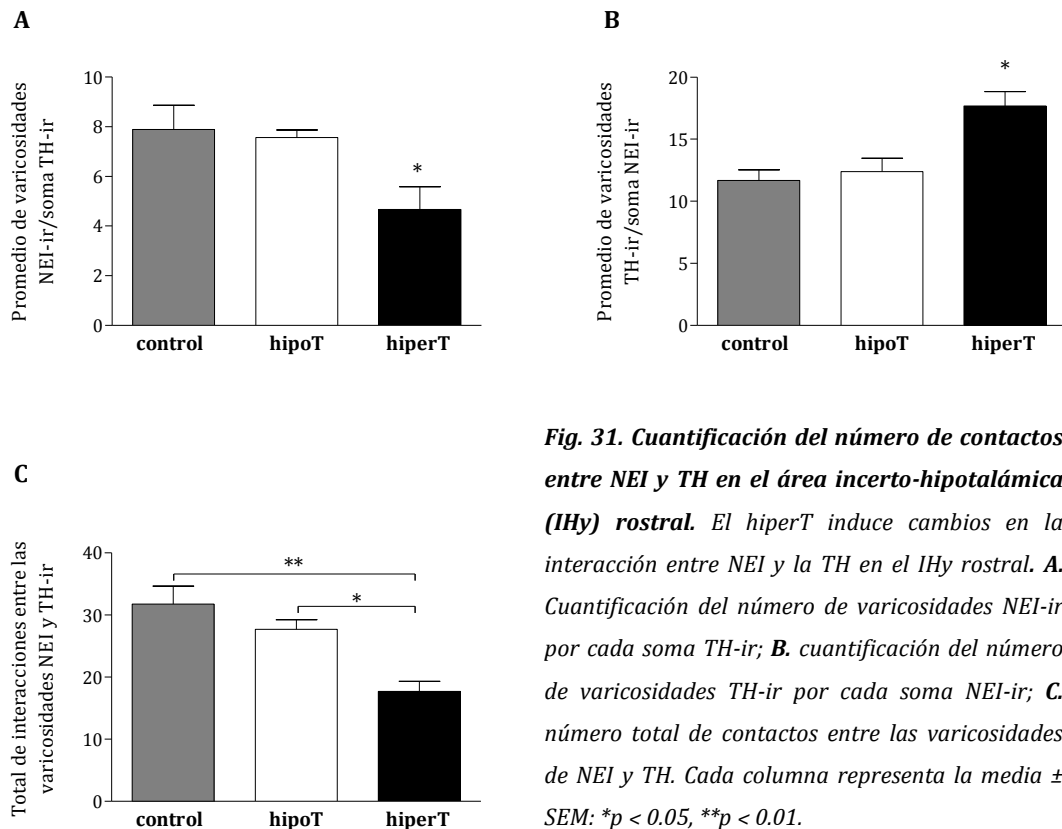


Fig. 30. Imagen de microscopio confocal en el IHy rostral de un animal control, con la correspondiente reconstrucción tridimensional (3D) de los canales verde (NEI) y rojo (TH). Se observan los somas, fibras y botones correspondientes a NEI y a TH. Esta reconstrucción 3D fue llevada a cabo en un total de 15 neuronas NEI-ir en un área que incluyese los somas y las fibras de TH relacionados con cada célula de NEI y para cada grupo (control, hipoT e hiperT). La interacción entre NEI y TH fue determinada cuantificando el número de varicosidades de la TH sobre cada uno de los somas NEI-ir, el número de varicosidades de NEI sobre los somas TH-ir y el número de contactos entre las terminales de NEI y de TH (las flechas señalan cada uno de estos contactos). **A.** Imagen de inmunofluorescencia del neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina amida (NEI: fluorescencia verde; marcado con FITC) y de tirosina hidroxilasa (TH: fluorescencia roja, marcado con Cy5) donde se observa la superposición de ambos canales; **B.** soma, axón y varicosidades NEI-ir; **C.** somas, axones y fibras TH-ir; **D.** reconstrucción 3D de la imagen B (frente y dorso); **E.** reconstrucción 3D de la imagen C (frente y dorso); **F.** Superposición de las imágenes B y C; **G** y **H** muestran la reconstrucción 3D de F (G: dorso y H: frente), las flechas indican los puntos de contacto entre NEI y TH. Barra de escala: 20 μ m.



3.3. B.1.2. Características de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67 en el IH_y caudal

En esta región los somas y varicosidades NEI-ir se encontraron cercanos a las fibras de TH; a esta distancia del bregma no se observaron somas de TH y el número de terminales disminuyó en relación a la porción rostral del IH_y. La marca de GAD-67 se observó como un puntillado que no permitió definir morfología celular y los botones marcados para esta enzima se encontraron cercanos a los somas y varicosidades de las neuronas que expresan NEI (Fig. 32).

3.3. B.1.2.1. Cuantificación de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67

No se observaron cambios significativos en la DO de NEI ni de GAD-67 en la porción caudal del IH_y; sin embargo, la expresión de TH se observó reducida en el hipoT y en el hiperT respecto al grupo control (Fig. 33).

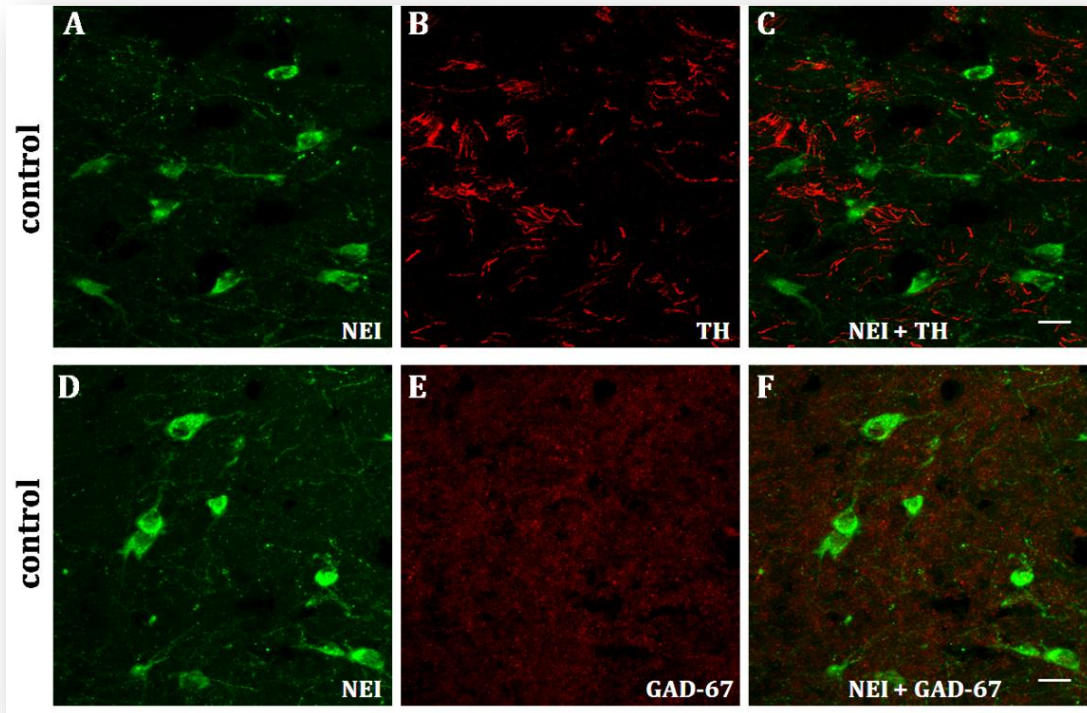


Fig. 32. Inmunofluorescencia de NEI, de TH y de GAD-67 en el IHy caudal en animal control. Caracterización de la inmunofluorescencia de los somas y terminales-ir del neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina amida (NEI: fluorescencia verde en A y D; marcado con FITC), de las fibras tirosina hidroxilasa-ir (TH: fluorescencia roja en B; marcado con Cy5) y de los botones ácido-glutámico-d Descarboxilasa-67-ir (GAD-67: fluorescencia roja en E; marcado con Cy5). En C y F se muestra la superposición de los canales verde y rojo. Barra de escala: 20 μ m.

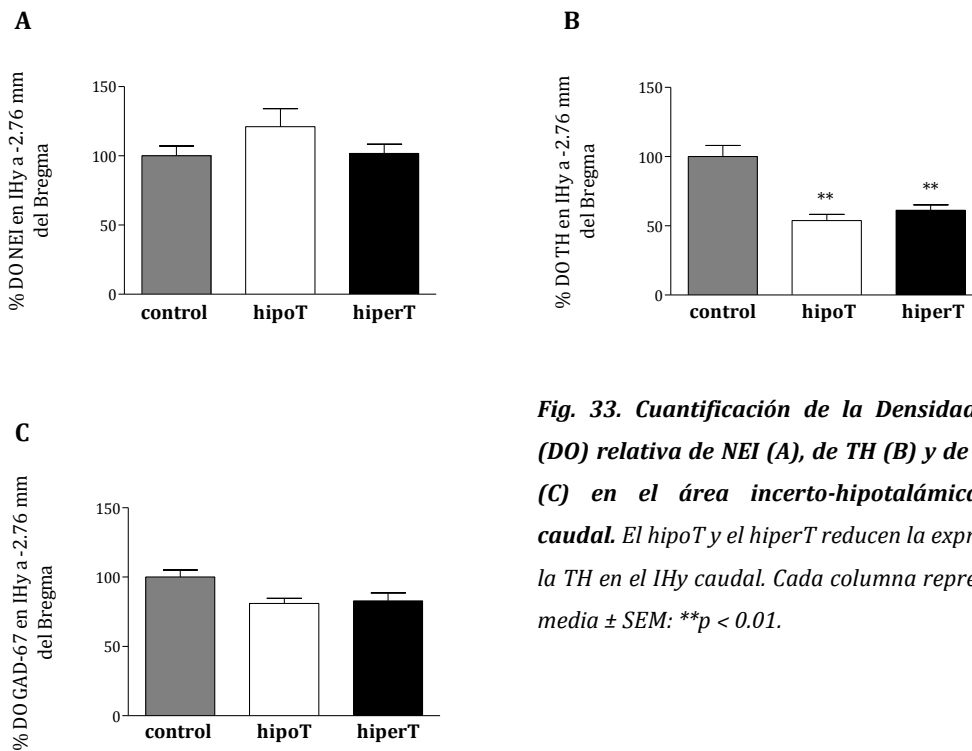


Fig. 33. Cuantificación de la Densidad óptica (DO) relativa de NEI (A), de TH (B) y de GAD-67 (C) en el área incerto-hipotalámica (IHy) caudal. El hipoT y el hiperT reducen la expresión de la TH en el IHy caudal. Cada columna representa la media \pm SEM: ** $p < 0.01$.

3.3. B.2. Región lateral subincerta de la porción peduncular del hipotálamo lateral (PLHLatSubI)

La PLHLatSubI corresponde a la región más dorsolateral del hipotálamo con presencia de células NEI-ir a aproximadamente -2.76 mm del Bregma. Se encuentra limitada dorsalmente por la ZI, lateralmente por la cápsula interna, ventralmente por la PLH y medialmente por el núcleo subincerto (SubI), no ha sido descrita previamente separada de la PLH.

3.3. B.2.1. Características de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67 en la PLHLatSubI

En esta región las células NEI-ir se disponen en dirección oblicua al eje longitudinal del cerebro, siguiendo la dirección de las fibras TH-ir. En todos los tratamientos, los somas y las fibras NEI-ir se encuentran rodeados de fibras TH-ir (Fig. 34A-C) y de botones GAD-67-ir (Fig. 34D-F).

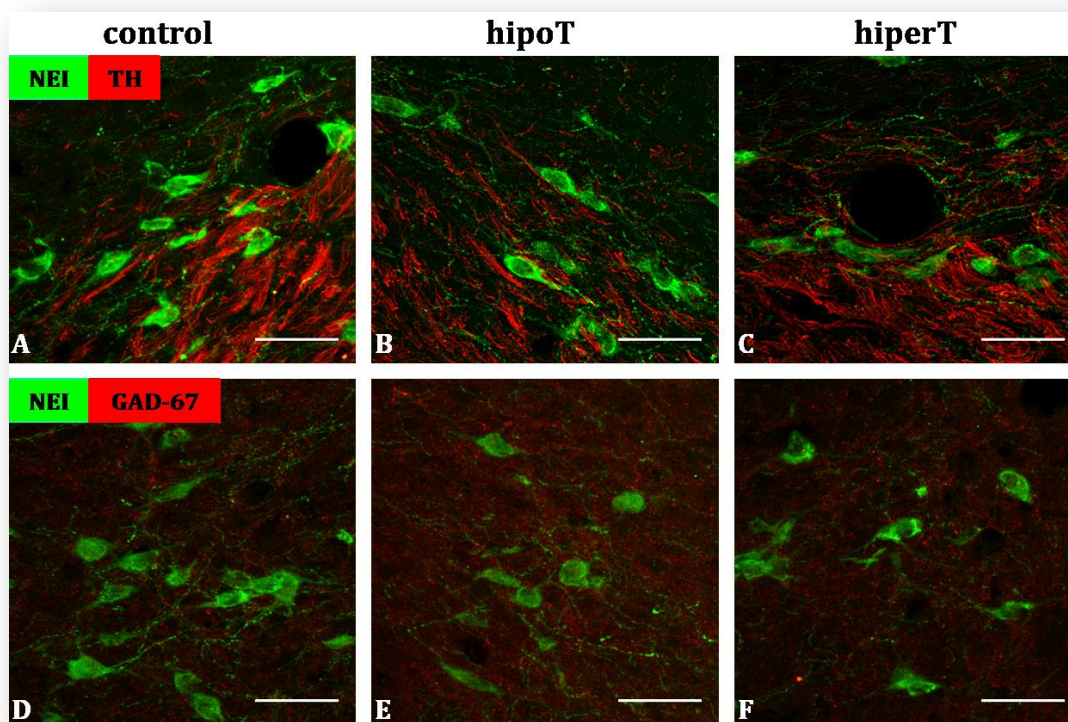


Fig. 34. Inmunofluorescencia de NEI, de TH y de GAD-67 en la PLHLatSubI en animal control, hipoT e hiperT. Caracterización de la inmunofluorescencia de los somas y terminales de NEI (A-F, fluorescencia verde, FITC), de las fibras TH-ir (A-C, fluorescencia roja, Cy5) y del puntillado de GAD-67 (D-F, fluorescencia roja, Cy5). Barra de escala: 50 μ m.

3.3. B.2.2. Cuantificación de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67

En la PLHLatSubI la DO relativa de NEI y de GAD-67 no se observaron modificadas por los tratamientos. En el caso de TH, se observó un patrón opuesto entre ambos tratamientos: disminución de su expresión en el hipoT y aumento en el hiperT (**Fig. 35**).

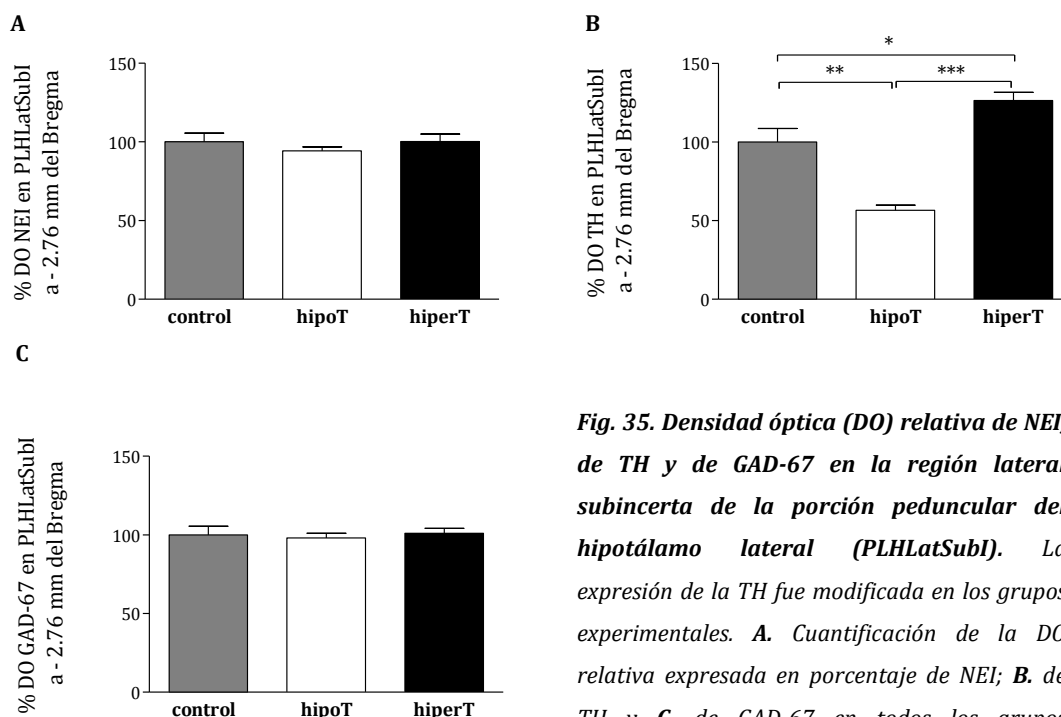


Fig. 35. Densidad óptica (DO) relativa de NEI, de TH y de GAD-67 en la región lateral subincerta de la porción peduncular del hipotálamo lateral (PLHLatSubI). La expresión de la TH fue modificada en los grupos experimentales. **A.** Cuantificación de la DO relativa expresada en porcentaje de NEI; **B.** de TH y **C.** de GAD-67 en todos los grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. B.2.3. Evidencia de la interacción de los somas y varicosidades NEI-ir con las fibras TH-ir

Por medio de la reconstrucción 3D se demostró una estrecha relación entre las fibras TH-ir con los somas y varicosidades NEI-ir en la PLHLatSubI (**Fig. 36**).

3.3. B.2.4. Cuantificación de los puntos de contacto entre NEI y TH

El número de contactos de las varicosidades TH-ir sobre los somas que expresan NEI se observó aumentada en el grupo hiperT (**Fig. 37A**), mientras que el número de interacciones entre las terminales de NEI y de TH se incrementó en el grupo hiperT pero sólo respecto al hipoT (**Fig. 37B**).

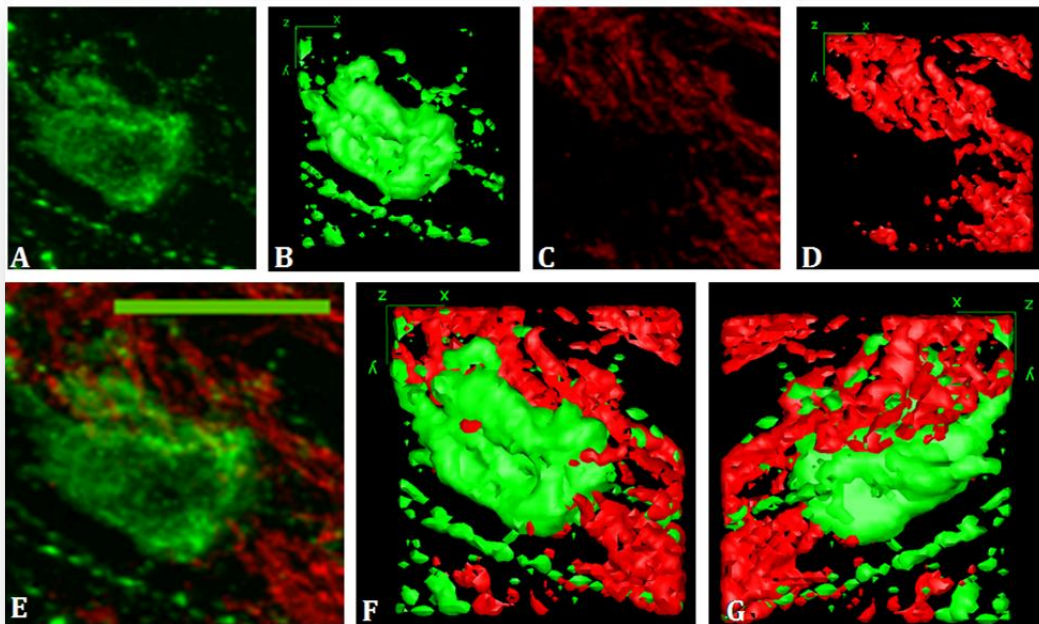


Fig. 36. Magnificación de una imagen de microscopio confocal en la región lateral subincerta de la porción peduncular del hipotálamo lateral (PLHLatSubI) de animal control con la correspondiente reconstrucción tridimensional (3D) de los canales verde (NEI) y rojo (TH). Esta imagen corresponde a una neurona NEI-ir con fibras y botones -ir para el péptido y fibras de TH. La reconstrucción 3D permite observar la estrecha relación entre las fibras de TH y el soma NEI-ir, así como la interacción de los botones de NEI con las fibras de TH; dicha reconstrucción fue llevada a cabo en un total de 23 somas NEI-ir con las correspondientes terminales de TH que se encontraban relacionadas a los mismos. **A.** Imagen de inmunofluorescencia del neuropéptido ácido-glutámico-isoleucina amida (NEI: fluorescencia verde; marcado con FITC); **B.** reconstrucción 3D correspondiente a la imagen A; **C.** imagen de inmunofluorescencia de tirosina hidroxilasa (TH: fluorescencia roja, marcado con Cy5); **D.** reconstrucción 3D correspondiente a la imagen C; **E.** superposición de las imágenes A y C; **F.** representa la superposición de B y D de frente y **G.** representa la superposición de B y D al dorso. Barra de escala: 20 µm.

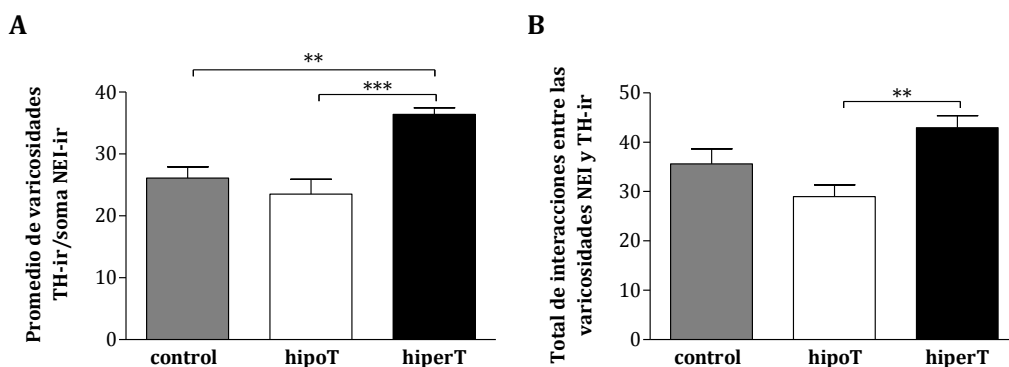


Fig. 37. Cuantificación del número de contactos entre NEI y TH en la PLHLatSubI. En el grupo hiperT aumenta el número de varicosidades TH-ir sobre los somas NEI-ir, mientras que no se modifica el total de interacciones entre las varicosidades de NEI y TH respecto al control. **A.** Cuantificación del número de varicosidades TH-ir por cada soma NEI-ir; **B.** número total de contactos entre las varicosidades de NEI y TH. Cada columna representa la media \pm SEM: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

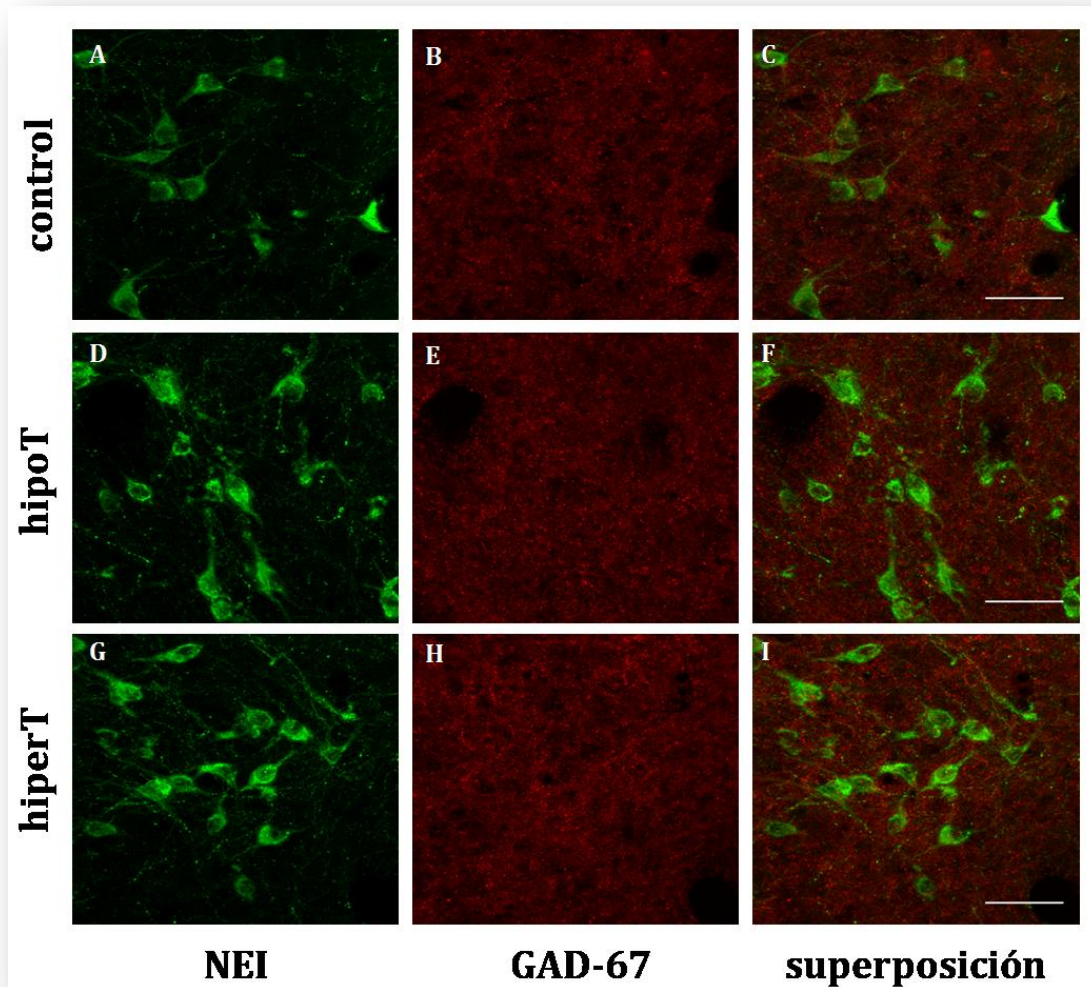


Fig. 38. *Inmunofluorescencia de NEI y de GAD-67 en el PLH₍₁₎ en animal control, hipoT e hiperT. A, D y G. Caracterización de la inmunofluorescencia de los somas y terminales de NEI (fluorescencia verde, FITC); B, E y H marca de GAD-67 (fluorescencia roja, Cy5); C, F e I superposición de los canales verde y rojo. Barra de escala: 50 μ m.*

3.3. B.3. Región peduncular del hipotálamo lateral (PLH)

Se tomaron dos imágenes correspondientes al PLH, una lateral (PLH₍₁₎) y otra medial (PLH₍₂₎).

3.3. B.3.1. Características de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67

En el PLH las fibras TH-ir se encuentran alrededor de los somas NEI-ir, observándose mayor cantidad de fibras en el PLH₍₁₎ respecto al PLH₍₂₎. Como en el resto de las áreas observadas, la marca de GAD-67 se observó como un puntillado alrededor de los somas NEI-ir (**Fig. 38**).

3.3. B.3.2. Cuantificación de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67

En la PLH₍₁₎ se observó un aumento en la expresión de NEI y una reducción de la expresión de TH en el hiperT, mientras que ni el hipo- ni el hiperT modificaron la expresión de GAD-67 (**Fig. 39A-C**).

En la PLH₍₂₎ se observó un aumento en la DO de NEI en el hipoT y el efecto opuesto fue observado en el hiperT; la expresión de TH se redujo en el hipoT y la DO de GAD-67 no se modificó en ninguno de los grupos analizados (**Fig. 39D-F**).

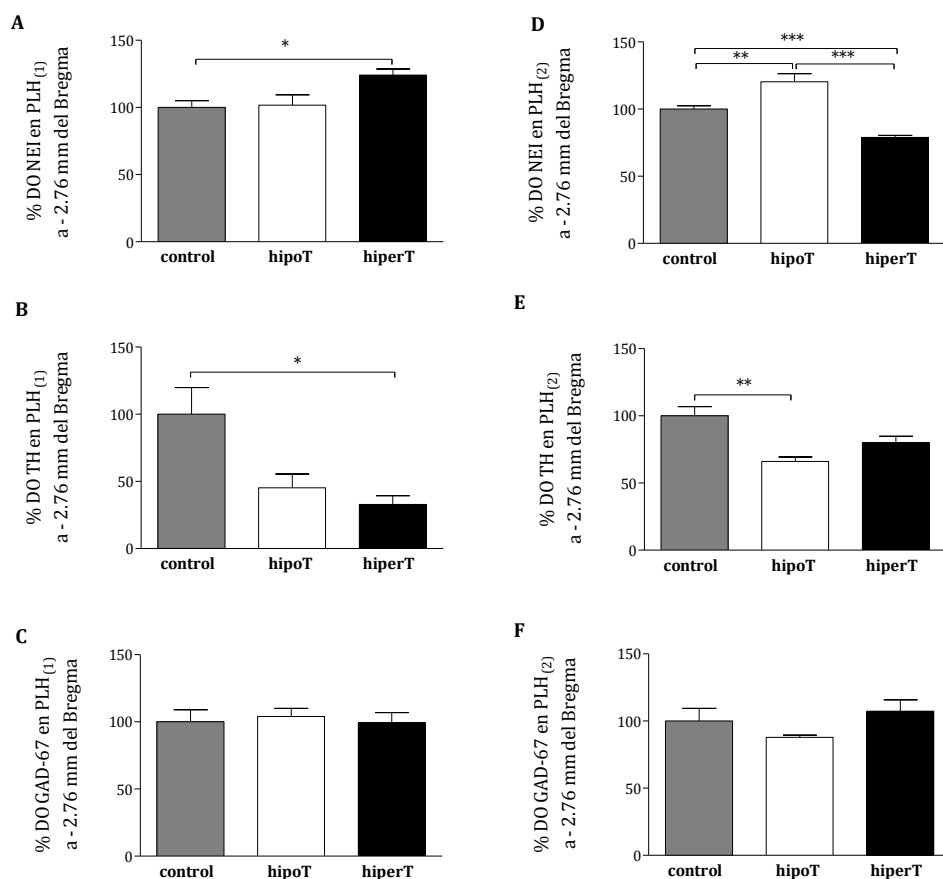


Fig. 39. Densidad óptica (DO) relativa de NEI, de TH y de GAD-67 en la región peduncular del hipotálamo lateral (PLH) a - 2.76 mm del Bregma. El hipoT y el hiperT modifican la expresión de NEI y de TH. Cuantificación de la DO relativa de NEI, de TH y de GAD-67 en la PLH₍₁₎ (A-C respectivamente); cuantificación de la DO relativa de NEI, de TH y de GAD-67 en la PLH₍₂₎ (D-F respectivamente) en todos los grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. B.4. Núcleo perifornical (PeF)

3.3. B.4.1. Características de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67

En el PeF los somas NEI-ir se observaron formando un aglomerado que respeta la morfología de dicho núcleo (**Fig. 40**), se encontraron escasas fibras TH-ir, mientras que la marca de GAD-67 se presentó como un puntillado entre las células NEI-ir.

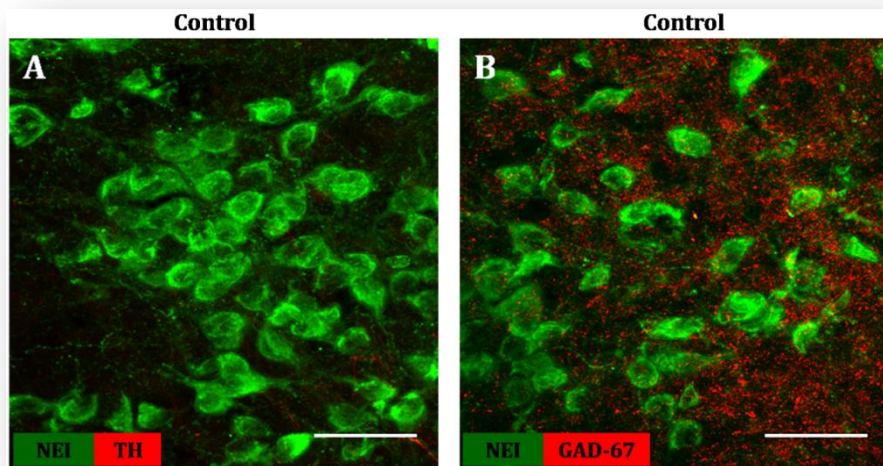


Fig. 40. Inmunofluorescencia de NEI, de TH y de GAD-67 en el núcleo perifornical (PeF) en animal control.
A. Disposición en aglomerado de las células NEI-ir (verde: FITC) con escasa presencia de fibras TH-ir (rojo: Cy5);
B. Disposición de los somas NEI-ir (verde: FITC) rodeados de botones GAD-67-ir (rojo: Cy5). Barra de escala: 50 μ m.

3.3. B.4.2. Cuantificación de la expresión de NEI, de TH y de GAD-67

En el PeF tanto el hipoT como el hiperT redujeron la expresión de NEI (**Fig. 41A**). El hipoT redujo la DO de TH respecto al grupo hiperT (**Fig. 41B**) mientras que la expresión de GAD-67 fue menor en el hipoT respecto del control (**Fig. 42C**).

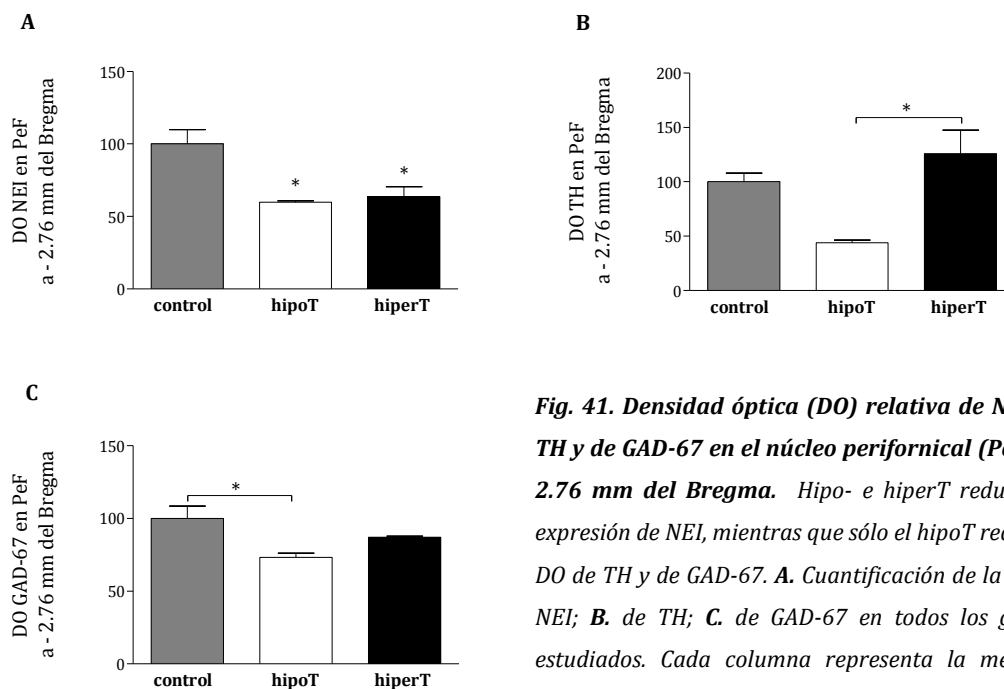


Fig. 41. Densidad óptica (DO) relativa de NEI, de TH y de GAD-67 en el núcleo perifornical (PeF) a - 2.76 mm del Bregma. Hipo- e hiperT reducen la expresión de NEI, mientras que sólo el hipoT redujo la DO de TH y de GAD-67. **A.** Cuantificación de la DO de NEI; **B.** de TH; **C.** de GAD-67 en todos los grupos estudiados. Cada columna representa la media \pm SEM: * $p < 0.05$.

3.3. B.6. Eminencia media (ME)

3.3. B.6.1. Características de la expresión de NEI

La ME se divide principalmente en dos capas: una dorsal que se encuentra en contacto con el tercer ventrículo (3v) denominada lámina interna y otra ventral llamada lámina externa. Las varicosidades NEI-ir se encuentran en mayor densidad en la lámina interna (Fig. 42 A y B). En todos los tratamientos se observó la misma disposición de las fibras de NEI (Fig. 42 C-K).

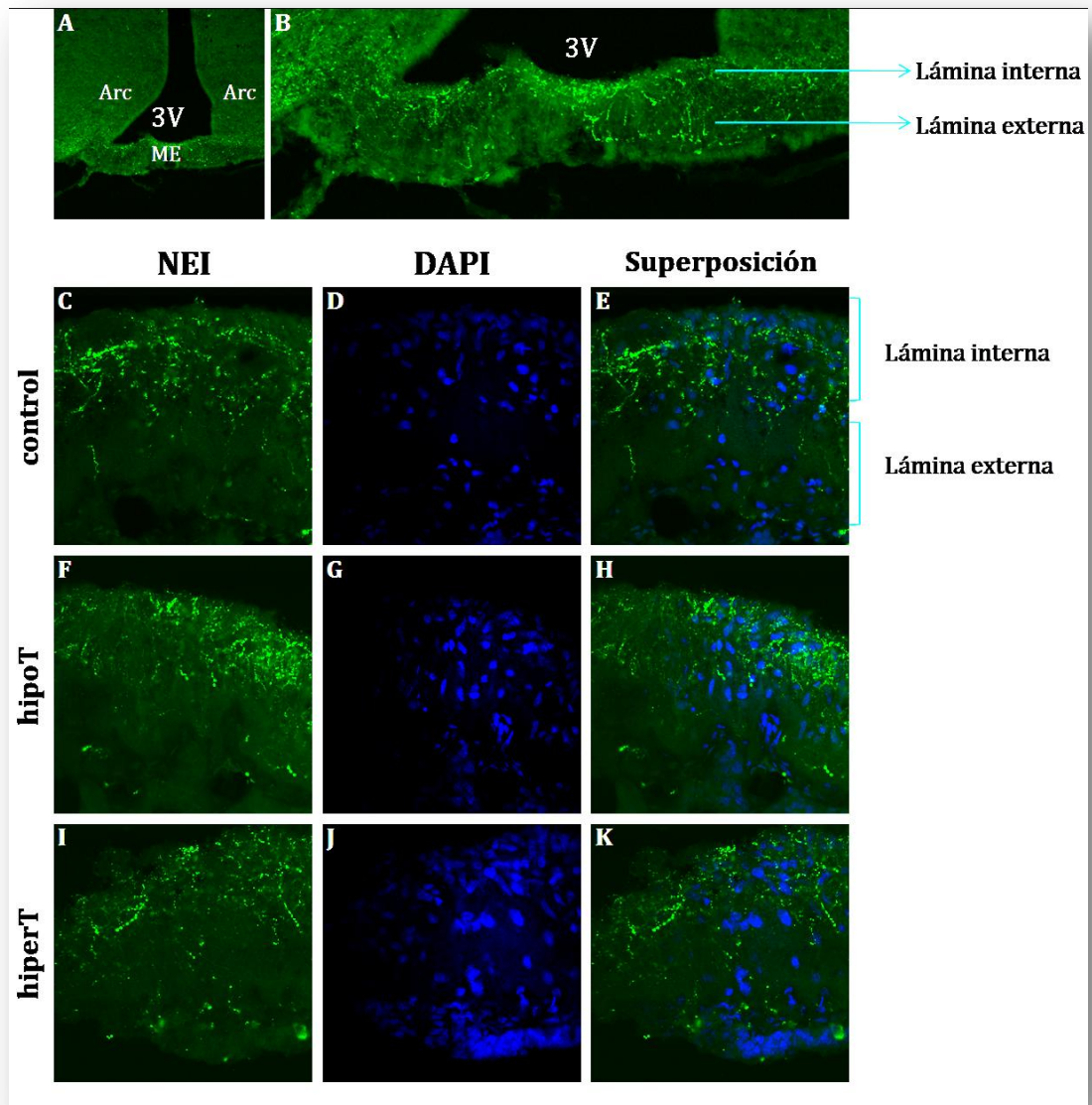
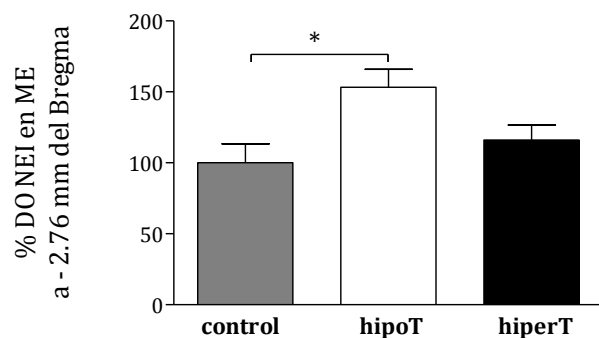


Fig. 42. Inmunofluorescencia (IF) de NEI en la ME en control, *hypoT* e *hyperT*. Se observa la disposición de las fibras NEI-ir en mayor densidad en la lámina interna de la ME tanto en controles como en tratados. **A.** Imagen tomada a 10x donde se observan la ME, el núcleo arcuato (Arc) y el tercer ventrículo (3V); **B.** Magnificación de la ME de la imagen A donde se pueden distinguir las fibras NEI-ir (fluorescencia verde: FITC) dispuestas en la lámina interna. **C, F e I.** muestran las fibras NEI-ir en control, *hypoT* e *hyperT* respectivamente; **D, G y J.** núcleos celulares identificados con DAPI (fluorescencia azul) localizados en la ME; **E, H y K.** superposición de los canales verde (NEI) y azul (DAPI). **C-K:** imágenes adquiridas a un aumento de 60x.

3.3. B.6.2. Cuantificación de la expresión de NEI

En la ME se observó un aumento significativo en la expresión de NEI en el hipoT (**Fig. 43**).



*Fig. 43. Cuantificación de la densidad óptica (DO) relativa de NEI en la eminencia media (ME) a -2.76 mm del Bregma. El hipoT induce un aumento en la expresión de NEI en esta área. Cada columna representa la media \pm SEM: * $p < 0.05$.*

3.3. B.7. Resultados del análisis de colocalización entre NEI y GAD-67

No se halló colocalización de NEI y GAD-67 en ninguna de las áreas estudiadas de los distintos grupos utilizados en el presente trabajo.

3.3. C. NEI COLOCALIZA CON EL TRH-R1 EN EL PLHLatSubI Y EN LA PLH

3.3. C.1. Características de la expresión del TRH-R1

La marca de TRH-R1 se observó en todos los somas NEI-ir y en somas correspondientes a otras células como un puntillado que permite distinguir la morfología celular (**Fig. 44A-C**)

3.3C.2. Resultados del análisis de colocalización entre NEI y el TRH-R1

El análisis de colocalización entre NEI y el TRH-R1 se realizó en la PLHLatSubI y en la PLH, en ambas áreas y en todos los grupos estudiados se determinó la colocalización positiva entre ambos (**Fig. 44**).

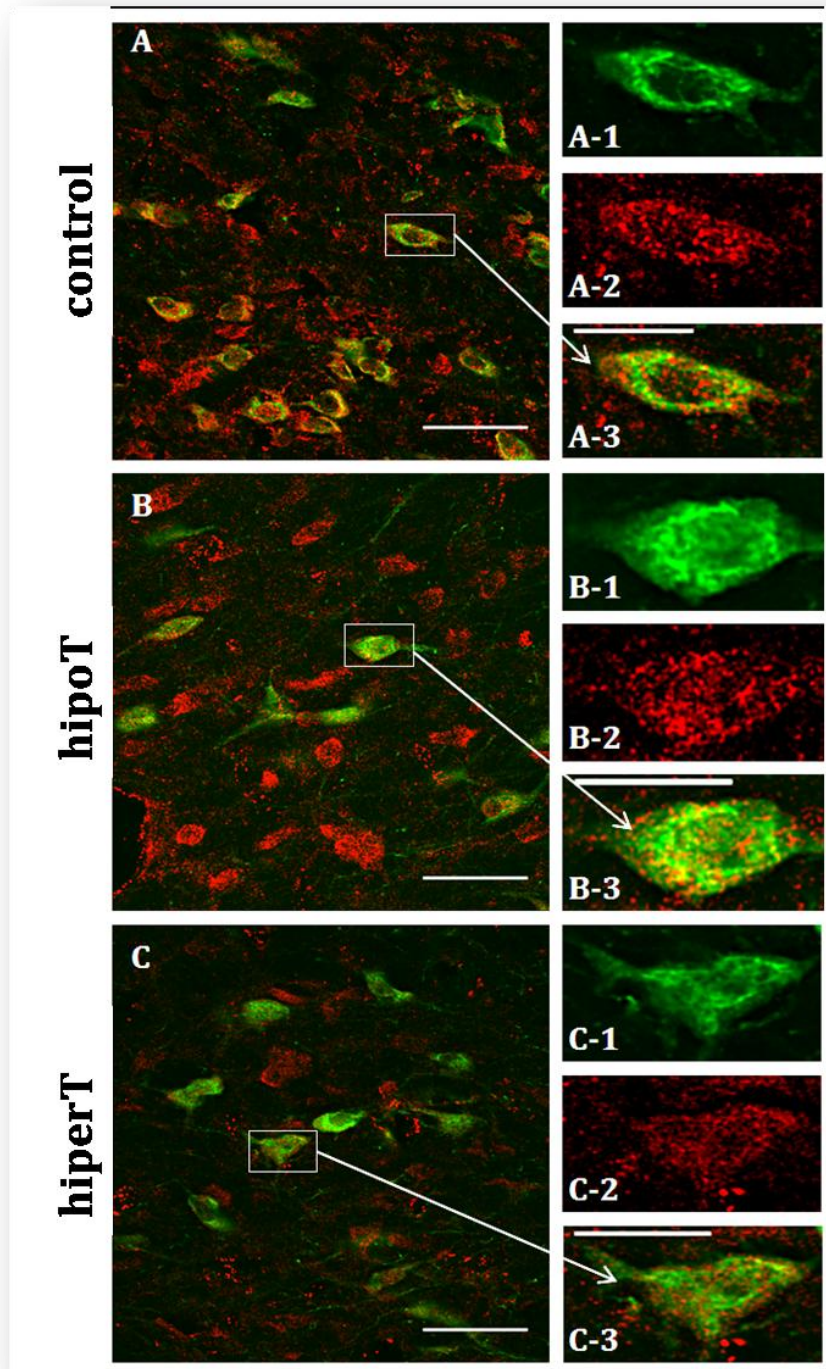


Fig. 44. Imágenes de inmunofluorescencia donde se evidencia la colocalización de NEI con el TRH-R1 en el control, el hipoT y el hiperT. A-C. IF de NEI (fluorescencia verde: FITC) y de TRH-R1 (fluorescencia roja: Alexa 568) en control, hipoT e hiperT respectivamente; A-1 a A-3. magnificación de una célula de la imagen A (A-1: NEI, A-2: TRH-R1, A-3: superposición de A-1 y A-2); B-1 a B-3. magnificación de una célula de la imagen B (B-1: NEI, B-2: TRH-R1, B-3: superposición de B-1 y B-2); C-1 a C-3. magnificación de una célula de la imagen C (C-1: NEI, C-2: TRH-R1, C-3: superposición de C-1 y C-2). La barra de escala es de 50 μm para A, B y C y de 20 μm en las imágenes magnificadas.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demuestra por primera vez que la concentración del neuropéptido EI en el hipotálamo de la rata adulta de ambos sexos se modifica de forma dependiente de la función tiroidea. Es interesante destacar que en ambos modelos experimentales, hipoT e hiperT, se observaron cambios puntuales de la concentración del péptido en los homogenatos de las distintas áreas extraídas y en la expresión celular del mismo en las regiones hipotalámicas estudiadas. La importancia de estos resultados reside en que posiblemente la alteración en el normal funcionamiento del eje HHG y la fisiopatología de las patologías neuropsiquiátricas observadas en el hipo- e hipertiroidismo, puedan ser mediadas por modificaciones en la síntesis, clivaje, liberación y degradación de NEI y en consecuencia de su acción.

El hipotálamo representa una zona amplia y compleja localizada en la porción ventral del encéfalo (135), se encuentra dividido en distintas regiones y núcleos interconectados que intervienen a nivel central en la regulación de la reproducción, de comportamientos motivados como el motor y el sexual, el ciclo vigilia/sueño, el control de la ingesta, entre otros y periféricos tales como la síntesis y la secreción de factores de liberación que intervienen en distintos ejes como el HHG y el eje HHT. Las áreas hipotalámicas incluidas en este estudio permiten realizar un análisis detallado y a la vez complejo de los resultados y su posible correlación con los efectos del hipo- e hipertiroidismo principalmente sobre la fisiología reproductiva.

La fisiología reproductiva es diferente en el macho y en la hembra, siendo probablemente la secreción fásica de la LH de la glándula pituitaria la diferencia sexual más importante. En la rata hembra, los niveles plasmáticos del estradiol aumentan durante el ciclo estral y dan lugar a un incremento masivo en la secreción de la LH en la tarde del P (138); mientras que el patrón de secreción de esta última en los machos es pulsátil y no presenta un pico de liberación máxima. Estas diferencias se expresan a nivel del SNC en ciertos núcleos y áreas hipotalámicas llamadas regiones sexualmente dimórficas, que se desarrollan en la etapa gestacional por la acción de los esteroides gonadales (EG) que actúan durante un período llamado “período crítico de diferenciación sexual del cerebro” determinando dicho dimorfismo. En los machos la testosterona secretada por los testículos en desarrollo es aromatizada en el SNC generando estradiol y produciendo a este nivel modificaciones que se traducen en características sexo-específicas de la endocrinología reproductiva y del comportamiento en los adultos. Distintos mecanismos se encuentran involucrados en la generación de estas diferencias tales como la neurogénesis, la migración y la supervivencia celular. Constituyen regiones sexualmente dimórficas el AVPV, el núcleo preóptico medial (MPN) del POA, el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y el VMH (139).

Tanto el OVLТ como el AVPV se encuentran particularmente relacionados al control de la reproducción, ambos representan dos regiones interconectadas localizadas en la porción ventral y rostral del POA a una distancia del Bregma entre 0.60 y 0.12 mm el OVLТ y entre 0.12 a -0.12 mm el AVPV (135). Por la metodología utilizada en la toma de la muestra es probable que los resultados obtenidos correspondan mayormente al AVPV (esta área se extrajo en su totalidad, mientras que del OVLТ fue resecada sólo su porción más caudal).

En el presente trabajo se observó que en la rata hembra eutiroidea la concentración de NEI presenta un patrón de variación cíclica y que dicha característica se pierde en el hipo- y en el hiperT. El AVPV es particularmente importante en la integración de la retroalimentación positiva ejercida por los EG para que luego se genere el pico de la LH. Contiene una alta densidad de neuronas con ER- α y β y receptores de progesterona modulados por las variaciones en los EG (139–141). El estradiol induce en esta área un aumento en la expresión de los receptores de la progesterona (142) y la acción de ésta sobre sus receptores en el P-PM es la responsable del pico de la LH. Si el aumento del estradiol se retrasa y por lo tanto no precede al incremento de la progesterona, la inducción de la expresión de sus receptores no se produce y en consecuencia el pico de la LH no alcanza los valores necesarios para inducir la ovulación. Los resultados obtenidos en las hembras hipo- e hiperT muestran que en estos grupos se produjo una alteración de los valores circulantes del estradiol, la progesterona y la LH. La posible modulación de las fibras de NEI en el AVPV por parte de los EG y la alteración de la misma en el hipo- e hiperT no había sido demostrada aún, siendo los resultados observados en la presente tesis indicadores de que éste sería el mecanismo por el que estas disfunciones alterarían el patrón cíclico de NEI en esta área.

Las neuronas del AVPV inervan núcleos neuroendócrinos de la zona periventricular del hipotálamo tales como el PVH y el Arc. Proyecciones ascendentes dorsales inervan el septum ventrolateral y el BNST, otras fibras se proyectan rostralmente alcanzando las neuronas de la GnRH que se encuentran en los alrededores del OVLТ (143), regiones todas con presencia de fibras que expresan NEI (16).

En roedores, los cuerpos celulares de las neuronas de GnRH se localizan principalmente en la porción rostral del POA que incluye al OVLТ y al AVPV, además en el OVLТ hay una alta densidad de fibras GnRH-ir (144, 145). La GnRH corresponde al primer punto de la regulación del eje HHG, siendo la relación de NEI con las neuronas y fibras que expresan esta hormona demostrada previamente (39).

La GnRH es liberada desde la lámina externa de la ME a los vasos porta-hipofisarios para alcanzar la adenohipófisis y estimular la síntesis y la liberación de las gonadotrofinas

que a su vez actúan sobre los ovarios y los testículos para regular la secreción de los EG e inducir la ovulación o la producción de esperma (146, 147). Tanto el OVLT como la ME, junto con el órgano subfornical y el área postrema, son órganos circunventriculares (carecen de barrera hemato-encefálica y se encuentran en contacto directo con la circulación). Recientemente se ha demostrado que las dendritas de GnRH que proyectan hacia el OVLT se dirigen fuera del mismo quedando expuestas a la circulación; en ese mismo trabajo se señaló que aproximadamente el 85% de las neuronas que expresan esta hormona con cuerpos celulares situados a menos de 100 μm de esta área expresan c-Fos en el momento del pico de GnRH/LH y aproximadamente el 70 % de éstas extienden sus dendritas hacia el OVLT, contribuyendo probablemente al efecto provocado por la GnRH liberada desde la ME (148).

La presencia de las varicosidades que expresan NEI en la periferia del OVLT y en el AVPV, en alta y moderada densidad respectivamente, ha sido demostrada por Bittencourt JC *et al.* en el año 1992 (16); mientras que la relación entre las terminales de NEI y los somas y fibras que expresan la GnRH en la rata hembra fue descrita por Attademo AM *et al.* en el año 2006. En dicho trabajo se observó que en la tarde del día del P hay una intensa distribución de fibras de NEI en el OVLT y que en el AVPV aproximadamente el 10% de las neuronas que expresan GnRH-c-Fos reciben terminales del péptido (39). Así como se sospecha que la GnRH podría ser liberada en forma directa desde el OVLT, la presencia de fibras de NEI en esta área haría pensar que este neuropéptido podría no sólo modular a la GnRH sino también liberarse y ejercer una acción directa sobre la adenohipófisis.

Por lo tanto, es posible que uno de los mecanismos por los que el hipo- y el hiperT producirían alteraciones en el ciclo sexual de la rata hembra sea por cambios ejercidos sobre la concentración de NEI, modificando el accionar del péptido a nivel de la modulación de la neurona y de las fibras que expresan la GnRH, como de su propia síntesis y liberación. En el modelo hipoT el déficit de las THs a nivel hipotalámico en la rata hembra debe ser estudiado ya que debido a la sensibilidad del mismo a los cambios hormonales es posible que la inducción corta del hipoT ejerza efectos no sólo sobre los valores de los EG, de la TSH y reducción de los valores circulantes de las THs, sino que podría actuar a nivel central sobre la TRH y otros factores de liberación como la GnRH y sobre neuropéptidos como NEI. Seguramente la modificación del patrón cíclico de los EG influye en el efecto del hipoT sobre la concentración de NEI. En el hiperT el exceso de THs así como la modificación cíclica de los EG podrían ejercer modificaciones sobre la concentración y el mecanismo de acción de NEI en esta área.

En la rata macho eutiroidea la concentración de NEI en esta área sería regulada de manera diferencial en AM y PM, liberándose en PM hacia otras regiones hipotalámicas,

probablemente para ejercer efectos sobre el comportamiento reproductivo; el déficit o el exceso de las THs afectaría dicho patrón. La regulación del AVPV es diferente en la hembra y en el macho, en éstos recibe una intensa inervación del MPN que se encuentra altamente desarrollado y es el responsable de la correcta respuesta copulatoria, del SCN que influye en la regulación circadiana (141) e inervación GABAérgica proveniente del BNST (149). Las terminales que expresan el neuropéptido EI en el OVLT y en el AVPV podrían estar reguladas por fibras provenientes del SCN lo que fundamentaría una posible acumulación del péptido en AM y su posterior liberación en PM; el hipoT-7 y el hipoT-24 así como el hiperT, reducirían la acumulación del péptido en AM con la pérdida del patrón circadiano observado en el grupo control. Considerando que a nivel hipotalámico también exista, como a nivel de la corteza, un mecanismo de homeostasis ante el déficit periférico de las THs, es posible que en el hipoT-7 el efecto sobre la concentración de NEI sea consecuencia de la acción ejercida por otras hormonas o neurotransmisores.

El POA es una región localizada en la parte rostral del hipotálamo, subdividida en el LPO y el MPA. Ambas subregiones han sido involucradas en el control del ciclo vigilia-sueño (150–152) y en el control de la temperatura (150), el MPA interviene además en el control de la reproducción, la locomoción, el comportamiento sexual (153), el cuidado materno y la agresión. En la rata macho se ha demostrado que el MPA interviene en el comportamiento sexual y que esta acción está mediada por modificaciones en la actividad de la DA, la 5-HT (154) y el glutamato (153). La presencia de fibras de NEI en el LPO y en el MPA fue descrita por Bittencourt JC *et al.* en el año 1992 (16). Respecto a la acción del neuropéptido en esta área se ha demostrado que la inyección bilateral del mismo en el MPA de la rata hembra estimula el comportamiento sexual pero sin modificar la actividad de la DA ni de la 5-HT (35). Los resultados obtenidos en la rata hembra demuestran que en condiciones de eutiroidismo la concentración del péptido no se modifica durante el ciclo estral, por lo que las variaciones cíclicas del estradiol y la progesterona no ejercerían un efecto sobre la concentración de NEI en esta área. Attademo AM *et al.* demostraron que un gran porcentaje de neuronas que expresan en esta área GnRH-c-Fos en el P-PM reciben terminales del péptido, sin embargo es posible que la concentración total de NEI en esta área sea modificada ante estímulos específicos como por ejemplo la cópula. El enfrentamiento de la rata hembra con un macho a partir del P-PM y el análisis de la concentración de NEI en dichas condiciones, así como el de la DA, 5-HT, glutamato y la relación con los sistemas noradrenérgico y colinérgico, permitirían corroborar dicha hipótesis. En el modelo hiperT la concentración de NEI se mantuvo sin variaciones durante el ciclo pero en el D₂ los valores fueron significativamente mayores respecto al control.

Dicho incremento podría deberse a una acumulación del péptido para luego ser liberado hacia otras áreas hipotalámicas, por ejemplo al Arc y la ME. El modelo hipoT sí mostró un patrón de variación cíclica con valores máximos en el P-AM y en el E-AM pero sin diferencias significativas respecto a los valores hallados en el control. Es posible que el hipoT sensibilice en esta área la respuesta de NEI ante las variaciones de los EG pero, el mecanismo por el cual esto se produciría debería ser investigado en el futuro. La disminución de la concentración de NEI en el P-PM podría deberse a la liberación del péptido hacia otras áreas tales como el OVLT y el AVPV, mientras que su aumento en el E-AM podría deberse a una acumulación del mismo. La implicancia de dichos patrones en la fisiopatología de las alteraciones a nivel reproductivo observadas en el hipo- e hiperT deberán ser evaluadas en futuros experimentos.

Los resultados obtenidos en la rata macho eutiroidea mostraron que la concentración de NEI en el POA mantiene valores similares entre AM y PM, sí se observaron cambios en el hipoT e hiperT; en el hipoT hubo una reducción de NEI en PM, mientras que en el hiperT-4 se produjo un incremento de la misma en AM y una reducción en PM que podría deberse a la liberación del péptido hacia otras áreas como el Arc y la ME o a un aumento en la degradación del mismo. El hiperT-21 incrementó significativamente el número de terminales que expresan el péptido tanto en el MPA como en el LPO induciendo un remodelamiento de las mismas y en consecuencia aumentando el número de las sinapsis en las que NEI estaría involucrado.

El Arc y la ME son dos áreas hipotalámicas localizadas en la porción medial y ventral del eje rostro caudal del encéfalo aproximadamente entre -1.80 mm a -3.48 mm del Bregma (137). La ME constituye uno de los órganos circunventriculares, terminales neuroendócrinas provenientes de distintas regiones del hipotálamo llegan a la misma distribuyéndose en forma diferencial en sus láminas interna y externa y sus productos son liberados a la circulación porta-hipofisaria para estimular a la adenohipófisis (148, 155). Las fibras que expresan NEI se encuentran en moderada densidad principalmente en su lámina interna y en menor cantidad en la externa (16, 156). Attademo AM *et al.* demostraron en el año 2006 que en la tarde del P las terminales localizadas en la lámina externa se encuentran muy próximas a los vasos sanguíneos, sugiriendo su liberación directa al sistema porta-hipofisario para estimular en la adenohipófisis la liberación de la LH. Además, observaron una distribución similar entre las fibras de NEI y las varicosidades que expresan GnRH en dicha lámina, lo que indicaría la modulación de las mismas por parte del péptido (39).

Por la ausencia de la barrera hemato-encefálica, tanto la ME como el Arc representan sitios de interrelación directa entre los órganos periféricos y el cerebro (157).

Respecto al Arc, este núcleo representa una región heterogénea con expresión de distintos neurotransmisores y neuropéptidos, en ella se localizan las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) responsables del control neuroendócrino inhibitorio de la secreción de prolactina (158), neuronas que expresan neuropéptidos involucrados en el control de la ingesta tales como el péptido similar a galanina (GALP, galanin-like peptide), NPY, α -MSH y β -endorfina y otros como kipepsina que interviene en la regulación de la GnRH (159). En cuanto a las terminales se observa una intensa distribución de fibras gabaérgicas, colinérgicas, glutamatérgicas (157), serotoninérgicas (160) y una moderada densidad de fibras que expresan el neuropéptido EI (16). En relación al eje HHG, se ha demostrado que interviene en la regulación de la secreción de la GnRH, presenta una alta expresión de ER- α e indirectamente estaría involucrado en la regulación del comportamiento sexual (160).

Los resultados obtenidos en la rata hembra demuestran que esta área presenta, como otras, un patrón de variación cíclica de la concentración de NEI con un incremento de la misma en el E-AM. Dicho aumento podría deberse a una acumulación del péptido, por mayor liberación desde sus sitios de síntesis (IH, PLH y PeFLH) o proveniente de otras regiones que intervienen en el control de la reproducción como el AVPV. Para poder determinar si dicha acumulación se produce a expensas de la ME, del Arc o de ambos, será necesario analizar cada área por separado en futuros experimentos. Tomando en consideración la acción de NEI en la estimulación del pico de la LH, sería de esperar mayor concentración del mismo en la ME en el P-PM con una reducción marcada en el E-AM, por lo que es probable que el patrón hallado en la presente tesis sea mayormente dependiente del Arc. Estudios de este núcleo en el E-AM permitirán dilucidar cuál es la acción de NEI en este momento del ciclo.

En el grupo hipoT se observó el mismo patrón que en el control que, por la particularidad de la ME + Arc de carecer de barrera hemato-encefálica, es muy probable que la detección del déficit periférico de las THs así como de los niveles circulantes del estradiol y la progesterona, induzcan mecanismos de respuesta rápida que intenten mantener la concentración necesaria de NEI durante el ciclo.

En el modelo de hiperT se observó una mayor concentración de NEI en el P, lo que evidenciaría que ante el exceso de las THs en el SNC y en la circulación, hay menor capacidad para mantener regulado el sistema. La modificación en el patrón normal de NEI podría dar lugar a una estimulación deficitaria de la adenohipófisis y en consecuencia generar un incremento deficiente de la LH en el P-PM. Esta interpretación se apoya en los

resultados publicados por Freeman M *et al.* en el año 1976 que demostraron que la inducción del hiperT afecta el patrón normal de liberación de la LH por disfunción del Arc y no del MPA o de la adenohipófisis (161).

El Arc representa además un área sexualmente dimórfica, en la rata hembra recibe ocho veces más terminales provenientes del AVPV que en el macho (141) y por el contrario, en el macho hay mayor número de terminales serotoninérgicas (160). En la rata macho en AM la menor concentración de NEI se observó en el grupo hipoT-24, mientras que la expresión del péptido en las terminales de la ME mostraron valores significativamente mayores en el grupo hipoT respecto al control. Tal como fue expresado previamente, cuando se analiza la concentración de NEI en la ME + Arc, es necesario tener en cuenta la implicancia de cada área en el resultado. En el horario PM, tanto el hipoT-7 como el hiperT mostraron una mayor concentración de NEI, indicando que ante el déficit periférico de las THs o de su exceso, se altera el normal funcionamiento de esta región. La implicancia de la acción del neuropéptido EI en la ME y en el Arc sobre la fisiología reproductiva y el comportamiento sexual deberán ser un punto a ser evaluado en el futuro.

La regulación de NEI por parte de las células de la glia en las distintas subregiones del POA, en la ME y en el Arc debe ser tomada en cuenta, así como la modificación de la misma en el hipo- y en el hiperT. García Segura *et al.* publicaron hace unos años una revisión en la que se demuestra que estas células se encuentran involucradas en la regulación de la reproducción y que son sensibles a los EG, interviniendo en la remodelación transitoria de la conectividad neuronal en áreas hipotalámicas como el POA, el Arc y la ME entre otras (162). Además, estas células presentan un papel clave para el mantenimiento de los valores de la T₃ a nivel del SNC respondiendo al déficit periférico de THs mediante la conversión de T₄ a T₃ llevada a cabo por la deiodinas tipo II que se localiza en los tanicitos ubicados al pie del 3v (163), lo que podría explicar que en la ME + Arc el patrón cíclico de NEI no haya sido afectado en el hipoT.

De las zonas hipotalámicas en las que se localizan las neuronas que producen NEI, el IHy representa una región definida hace pocos años como tal, siendo considerada previamente como parte de la ZI. Sita LV *et al.* en el año 2007 la caracterizaron anatómicamente como el área comprendida en la unión del hipotálamo medial y la ZI a lo largo del eje rostro caudal del cerebro (18) y químicamente por la presencia del grupo de neuronas A13 y de MCH/NEI (16, 164). El límite rostral del IHy se encuentra aproximadamente a -1.88 mm del Bregma coincidiendo parcialmente con la ZI rostral

(ZIR) pero se extiende más dorsal y caudalmente comparada con ésta. Las porciones caudal y lateral de esta área coinciden en forma parcial con la ZI ventral (ZIV), medialmente se extiende hasta el tercer ventrículo y termina caudalmente a -3.14 mm del Bregma adyacente a la porción ventral del tracto mamilotalámico. La aplicación de trazadores anterógrados en las neuronas que expresan MCH/NEI localizadas en el IHy permitió a estos autores demostrar que la distribución de sus proyecciones difiere de las de la ZI, definiendo tres vías: dorsal, ventral descendente y ventral ascendente. La *vía dorsal* se extiende desde el sitio de la inyección rostro-dorsalmente hacia los núcleos del tálamo donde los axones se separan en dos componentes uno mayor y otro menor, las fibras del más denso proyectan hacia el núcleo precomisural, el núcleo de la comisura posterior y el área hipotalámica posterior donde este grupo de fibras se reúne con las de la vía ventral ascendente. En la *vía ventral ascendente* se observan fibras alrededor del sitio de la inyección que luego toman una dirección ventral y se separan en dos bandas a la altura del fórnix, una centro-medial que corre a través del borde de la porción magnocelular del PVH y a través de la región sub-paraventricular de este núcleo y termina en el Pe y otra, que para alcanzar el LHA toma un recorrido ventrolateral al fórnix a través del PeFLH donde se observa un moderado número de fibras y terminales. Luego los axones atraviesan el hipotálamo anterior y llegan al MPA, un moderado número se distribuye en el AVPV y en el núcleo preóptico mientras que pocas alcanzan el LPO, algunas se encuentran en el núcleo supraóptico y otras llegan al OVLT. Axones dispersos alcanzan la porción medial del BNST y la amígdala, pero la mayoría se extiende hasta la porción intermedia del núcleo lateral septal. Una escasa cantidad de fibras inervan el hipocampo y la corteza. En la *vía descendente ventral* un masivo número de fibras desciende ventralmente a través de la región periventricular del hipotálamo enviando algunas proyecciones al Pe e hipotálamo medial, donde se observa una región con moderada cantidad entre los núcleos dorso- y ventromedial. Desde la parte periventricular de esta vía se generan las terminales que se observan en el área hipotalámica dorsal e ingresan al área hipotalámica posterior. El área hipotalámica posterior recibe una densa cantidad de botones terminales y axones provenientes de las vías dorsal y descendente ventral. Esta vía genera una inervación difusa de los núcleos mamilares e intensa de la sustancia gris periacueductal y alcanzan algunos núcleos óculo-motores y el VTA. Respecto a la presencia de proyecciones contralaterales, la interacción más importante es la observada entre ambas IHy, donde fibras marcadas cruzan la línea media a nivel del sitio de la inyección para alcanzar la región contralateral (ver **Fig. 45**) (18).

El estudio de las proyecciones de la ZI demuestra un patrón de distribución principalmente lateral, diferente al de las fibras del IHy. Por lo tanto este área forma parte

del hipotálamo medial y posiblemente esté involucrada en la regulación de funciones neuroendócrinas como la reproducción y de comportamientos motivados como el sexual (18).

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que en el IHy la concentración de NEI no varía durante el ciclo estral en el grupo control, no habiendo una correlación entre las fluctuaciones en los niveles séricos del estradiol, la progesterona y la LH observadas durante el ciclo y los valores de NEI en esta región.

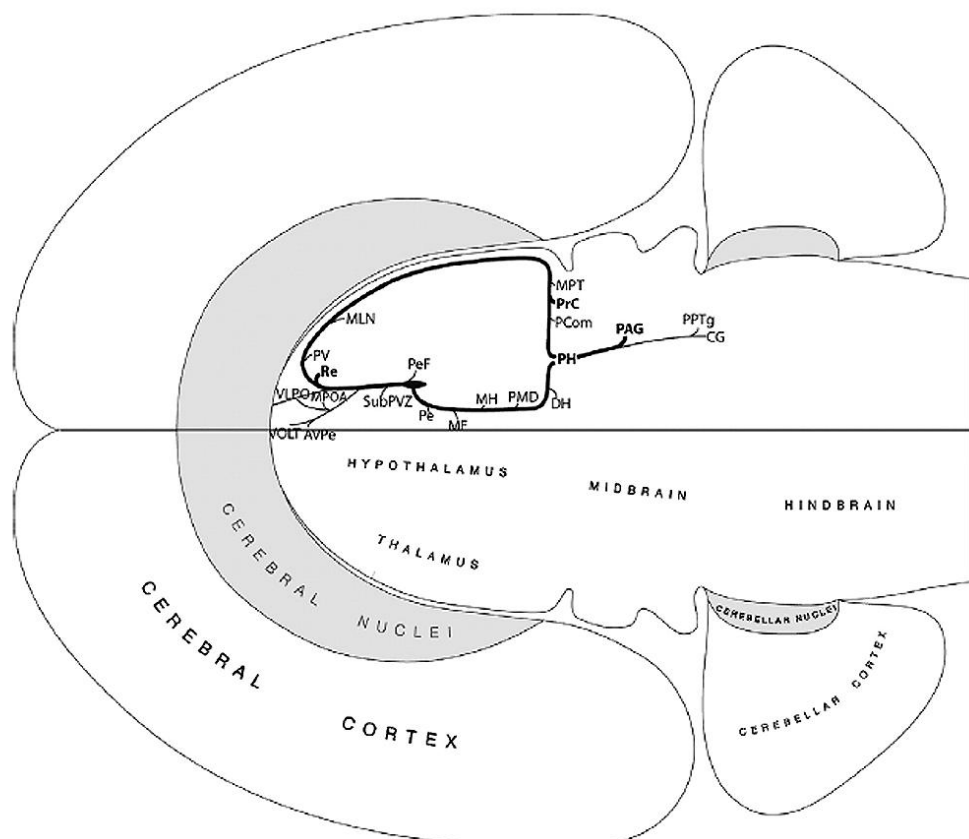


Fig. 45. Representación esquemática de la distribución de las proyecciones de MCH/NEI provenientes del IHy en un mapa plano del cerebro de la rata. AVPe: núcleo antero-ventroperiventricular, CG: protuberancia, DH: área hipotalámica central, ME: eminencia media, MH: hipotálamo medial, MLN: núcleo medial del tálamo, MPT: núcleo medial pretecal, PAG: sustancia gris periacueductal, PCom: núcleo de la comisura posterior, PH: núcleo hipotalámico posterior, PMD: núcleo dorsal premamilar, PPTg: núcleo tegmental pedúnculo pontino, PrC: núcleo precomisural, PV: núcleo paraventricular del tálamo, Re: núcleo reuniens, VMPO: núcleo preóptico ventromedial, VOLT: órgano vasculoso de la lámina terminal. Tomado de Sita LV et al. 2007 (18).

Es posible que la regulación ejercida por los EG sobre el neuropéptido EI se produzca en las terminales provenientes de esta área, por ejemplo las que proyectan al AVPV y la ME, no habiendo una acción directa sobre los somas. Mayor concentración de NEI fue observada en el hipoT-D₂-AM respecto al control que podría ser consecuencia de la

activación del mecanismo de homeostasis central de las THs (detección del déficit periférico de las THs, aumento de la conversión de T_4 a T_3 a nivel central e incremento compensatorio de la T_3), lo que induciría una mayor síntesis de NEI y acumulación del mismo en esta área. Aunque por supuesto la ocurrencia de dicho mecanismo en las distintas áreas hipotalámicas y en la rata hembra debe ser comprobado. En el modelo hiperT también se observó un aumento de la concentración de NEI en el D_2 y en el P-AM, que podría deberse al exceso de T_3 a nivel central como consecuencia de la administración periférica de la L- T_4 . Por lo tanto, se puede inferir que las THs inducirían en el IHy una mayor síntesis del neuropéptido EI.

El análisis de la expresión de NEI en el IHy de las ratas macho, demuestra que en la porción rostral de esta área el hipoT induce un aumento del contenido del péptido tanto a nivel de los somas como de sus fibras, mientras que dicho patrón no se observa en la porción caudal. Este incremento podría deberse a una mayor acumulación del péptido ante la detección de un déficit en la concentración de las THs. Por otro lado, la inducción prolongada del hiperT estimularía un mecanismo de homeostasis que no influye sobre la síntesis de NEI sino que intervendría a nivel de las prolongaciones dendríticas induciendo un remodelado de las mismas en esta área y por lo tanto un cambio en la interacción de las terminales de NEI con otros somas, como por ejemplo los dopaminérgicos. En este trabajo se demuestra por primera vez la presencia de puntos de contacto entre los somas y terminales que expresan el péptido y los de TH y que dicha relación se modifica ante la inducción prolongada del hiperT (**Fig. 46**). Futuros experimentos permitirán dilucidar la importancia de dicha relación determinando la existencia o no de un mecanismo de regulación mutua entre ambos sistemas y la implicancia del mismo en el control neuroendócrino de la reproducción e incluso del comportamiento. Caudalmente, se observó una disminución en la expresión de la TH que indicaría que tanto el déficit como el exceso de THs regulan estas fibras, posiblemente aumentando la liberación de DA desde estas terminales y disminuyendo su transporte en el hipoT.

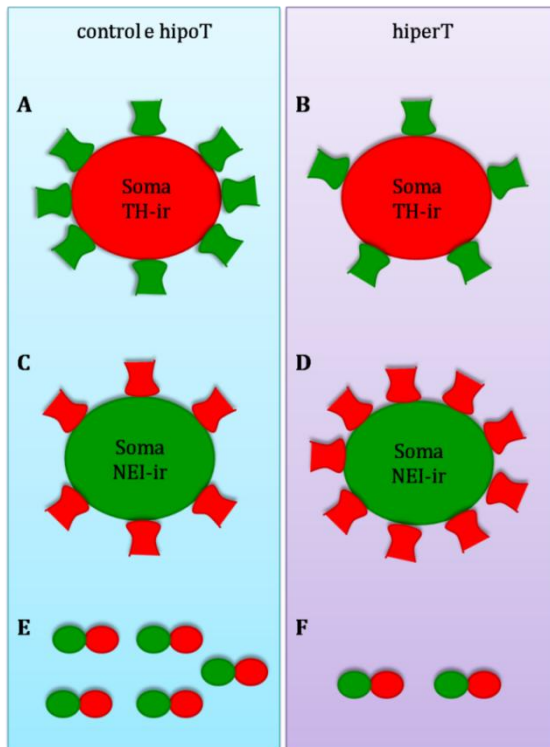


Fig. 46. Representación esquemática de la relación entre TH y NEI en el IHy rostral. El hiperT reduce el número de botones que expresan NEI (verde)/soma TH-ir (rojo), mientras que induce el efecto opuesto en la cuantificación del número de botones TH-ir/soma NEI-ir. Además, en el hiperT se reduce el número de contactos entre las varicosidades de NEI y las dopaminérgicas. A y B. promedio de varicosidades NEI-ir/soma TH-ir en los todos los grupos; C y D. promedio de botones TH-ir/soma NEI-ir en todos los grupos; E y F. número total de interacciones terminal NEI-ir (verde) /Terminal TH-ir (rojo).

El PeFLH es una región hipotalámica amplia y heterogénea que se extiende desde -2.16 mm a -3.96 mm de distancia al Bregma en el eje rostro-caudal del encéfalo de la rata (137), se encuentra rodeando al fórnix y entre los -2.64 mm a -3.60 mm contiene al PeF. Las neuronas que se distribuyen en esta región expresan distintos neurotransmisores y neuropéptidos tales como: glutamato (165), GABA (166), MCH y NEI (16), orexina e hipocretina (167) y en humanos también se demostraron neuronas que expresan TRH (75). Esta área se encuentra involucrada en funciones tales como el control de la ingesta (52), locomoción (168), regulación cardiovascular (169) y control del ciclo vigilia/sueño (170). Acorde a la bibliografía consultada para la presente tesis, la relación del PeFLH con el comportamiento sexual y el ciclo estral aún no ha sido estudiada.

Los resultados obtenidos en los machos permiten observar que en esta área la concentración y la expresión de NEI responden al déficit o al exceso de las THs mediante un mecanismo regulatorio complejo. Ante el déficit de T_3 en el hipoT-21 se produce una reducción significativa de la concentración del péptido en el PeFLH y de la expresión del mismo en el PeF, lo que podría indicar que la síntesis y el clivaje del péptido son sensibles a la reducción de los niveles de T_3 en esta área. Sin embargo, en el hiperT-4 no se observaron cambios respecto al control, lo que podría señalar que el exceso de THs por un período corto no afecta la síntesis de NEI. La concentración de NEI no se modificó en el hiperT-21 pero, en este mismo grupo se observa una reducción en la expresión del mismo en el PeF. Por lo que se puede pensar que, aunque mediante mecanismos diferentes, tanto el exceso como el déficit prolongado de las THs inducen en esta área una disminución de la

expresión del péptido ya sea por afectación de su síntesis y/o de su clivaje. Por otro lado, el hiperT-21 también podría producir en el resto del PeFLH aumento del número de terminales y de sinapsis en las que NEI está involucrado para mantener el correcto funcionamiento del péptido en esta área. Estudios de la expresión del ARNm de pp-MCH y de la expresión de la proteína PC2 (que es la enzima limitante en la producción de NEI maduro) y su posible modificación en el hipoT e hiperT podrían responder a estos interrogantes.

El déficit de T₃ también indujo en esta área una disminución en la expresión de TH y GAD-67 y no se observaron cambios en la misma en el hiperT. Por lo que las terminales de TH y de GAD-67 en el PeF serían sensibles al hipoT pero no al hiperT prolongado. La función de NEI en esta área deberá ser estudiada ya que puede estar relacionada a la regulación de la locomoción, al control del ciclo vigilia/sueño e incluso al comportamiento sexual en los machos.

En las hembras eutiroides se observó un patrón de variación cíclica de la concentración de NEI cuyo incremento en el P-PM coincide con el aumento de la progesterona y de la LH observadas en este momento del ciclo. Este patrón se vio alterado tanto en el hipo- como en el hiperT donde no se halló una inhibición de la ciclicidad sino un cambio de la misma. En las hembras, el PeFLH sería un área sensible a las variaciones del estradiol y la progesterona observadas durante el ciclo estral. Debido a que esta área interviene en comportamientos complejos, es posible que en el caso de la hembra se encuentre también involucrado en regulación del comportamiento sexual. Gonzalez MI *et al.* demostraron que NEI induce un aumento de la receptividad sexual en la rata hembra cuando se lo inyecta en el MPA (35), otros autores observaron que el MPA envía proyecciones a esta área (171), por lo que el MPA y el PeFLH podrían constituir dos regiones que regulen este comportamiento en forma conjunta.

De las áreas hipotalámicas donde se localizan los somas que producen NEI/MCH, el PeFLH es la única que presenta una variación cíclica de la concentración del péptido; otros autores han demostrado que las neuronas ocitocinérgicas localizadas en esta área son sensibles a los estrógenos (172), lo que apoyaría la sensibilidad de esta área a los EG y la variación de NEI en relación a los niveles de los mismos. Posiblemente la inyección de NEI en esta región y la posterior evaluación del comportamiento sexual de la rata hembra o el estudio de la relación de la expresión de este neuropéptido con las neuronas ocitocinérgicas, los ER y los receptores de progesterona durante el ciclo en hembras eutiroides, podrían demostrar la implicancia de la variabilidad en la concentración de NEI en esta área. La inducción del hipoT y del hiperT podría evidenciar cómo la acción del

péptido puede alterarse ante las modificaciones en los niveles circulantes del estradiol y la progesterona observados en estas patologías.

El PLH es la región más amplia del hipotálamo, se extiende desde aproximadamente -1.20 mm a -4.56 mm de distancia al Bregma en eje rostro-caudal del encéfalo (135), localizada entre la cápsula interna y el fórnix (156). Es de estructura y funcionalidad compleja debido a la gran heterogeneidad de las neuronas que la componen, además de estar atravesada por el haz medial del cerebro anterior (MFB, medial forebrain bundle). Inicialmente el estudio de sus funciones se realizó mediante experimentos clásicos donde se evaluaba la lesión de la misma y sus consecuencias; por ejemplo en humanos, el análisis de pacientes con encefalitis letárgica permitió demostrar que las estructuras del PLH son necesarias para mantener la fase de vigilia (173). Esta área interviene en la regulación de comportamientos complejos, participando en el procesamiento de la información sensorial y en la modulación de las respuestas motoras asociadas con el hambre, la sed, la agresión y la reproducción (174, 175). En esta región los somas neuronales que expresan NEI han sido muy estudiados en relación a la implicancia de la MCH en el control de la ingesta (45, 46, 53) y en la regulación del ciclo vigilia/sueño (44). Respecto a este último punto, se ha señalado que durante el período de sueño estos somas están activos mientras que en la vigilia se encuentran en reposo (44). Estudios llevados a cabo por el grupo del Dr. Nahon JL demostraron que las neuronas responsables de la síntesis de NEI se encuentran reguladas por distintos neurotransmisores y neuromoduladores tales como la DA, la NA, la ACh y la 5-HT (46, 53). También se ha demostrado su modulación por el GABA y el glutamato (176). En el análisis del patrón circadiano de la expresión del gen de pp-MCH en el hipotálamo de ratón (12/12-h ciclo luz/oscuridad) Stüz AM *et al.* demostraron que en el período de luz sus valores se mantienen estables mientras que aumentan en la fase de oscuridad, entre las 22 y las 10 h (20). Este antecedente apoyaría los resultados observados en el RIA de los machos donde no se encontraron diferencias entre AM y PM en la concentración de NEI. Sin embargo, la expresión celular del péptido se modificó en forma diferencial en las subregiones de donde fueron adquiridas las imágenes, indicando que debido a la amplitud de esta área, las células de NEI localizadas en distintos sitios de la misma reciben diferentes inputs y que a su vez éstos serían afectados por el hipo- y/o el hiperT, tal como se observó en el caso de la TH. Resultados publicados por el grupo del Dr. Nillni EA demostraron que la inducción del hipotiroidismo por 21 días genera un aumento de la expresión de la pro-TRH, la PC 1/3 y de la PC2 en el LHA, sin modificación en el número de las neuronas que colocalizan para la pro-TRH y la PC2, mientras que sí aumenta la colocación de la prohormona con la PC 1/3 (177). Este

incremento en la expresión de la PC2 podría estar relacionado al aumento en la expresión de NEI observado en el hipoT en el PLH₍₂₎. Como fue mencionado anteriormente, la PC2 es la enzima limitante en la generación de NEI maduro, por lo que la confirmación de su aumento en los somas que expresan el péptido sería un indicador del mayor clivaje del mismo. El análisis de la colocalización de NEI y de la PC2 y su modificación con el hipoT y el hiperT podrían corroborar esta hipótesis.

La expresión de la GAD-67 fue estudiada en esta región esperando encontrar colocalización entre el neuropéptido EI y esta enzima. Trabajos de otros autores han demostrado mediante estudios de hibridización *in situ* que aproximadamente el 87 % de las neuronas del IHy y del LHA co-expresan el ARNm de pp-MCH junto con el de GAD-67 (178); sin embargo, la expresión conjunta de esta enzima y el neuropéptido EI no había sido comprobada previamente. En el presente trabajo se pudo demostrar que la GAD-67 y NEI se encuentran en grupos neuronales diferentes y que la proximidad de botones GABAérgicos cercanos o en contacto con los somas y las fibras que expresan el péptido señalaría a los inputs GABAérgicos que intervienen en la regulación de estos somas. También es posible que en estas células haya una traducción débil del ARNm de GAD-67 o que una vez producida haya una gran liberación de la misma por lo que no pudo ser detectada en la IF.

Un trabajo publicado recientemente ha demostrado que la TRH tiene una acción inhibitoria sobre la célula que expresa MCH/NEI induciendo la hiperpolarización del potencial de membrana en reposo a través de la estimulación de las neuronas y de las terminales GABAérgicas que inervan estos somas (179); sin embargo, la acción directa de la TRH no ha sido evaluada. En el presente trabajo se demuestra por primera vez la presencia del TRH-R1 en la célula de MCH/NEI lo que indica que la TRH también ejercería una acción directa sobre estas neuronas y no sólo por intermedio de las terminales GABAérgicas presinápticas. La TRH además de su función hipofisotrófica interviene en la regulación de comportamientos complejos como la alimentación y la regulación del ciclo vigilia-sueño, por lo que el efecto de su acción sobre estos somas debería ser evaluada junto al análisis de dichos comportamientos.

En las hembras la concentración de NEI se mantuvo estable durante el ciclo en todos los grupos pero, los valores obtenidos en el hipoT fueron aproximadamente un 50% más bajos. Es importante tener en cuenta dos puntos para el análisis de estos resultados, por un lado, aparentemente la regulación de NEI en el PLH es diferente en el macho y en la hembra y por otro, el hipotiroidismo inducido por un período corto en esta última fue suficiente para provocar modificaciones en la concentración de NEI. Si bien no ha sido bien definida la inervación del PLH por parte de las fibras hipofisotróficas de la TRH

provenientes del PVH (70), es posible que proyecciones provenientes del PVH también ejerzan una acción sobre los somas de NEI, inhibiendo su síntesis y clivaje en el hipot durante los días de mayor variabilidad cíclica en los EG.

Por último, es necesario incluir el análisis de la PLHLatSubI que corresponde a la región más dorsolateral del LHA con presencia de células NEI-ir aproximadamente a -2.76 mm del Bregma. Se encuentra limitada dorsalmente por la ZI, lateralmente por la cápsula interna, ventralmente por la PLH y medialmente por el núcleo subincerto (SubI), no ha sido descrita previamente separada de la PLH ni tampoco del IHy (Fig. 47). En base a lo publicado por Sita LV *et al.* el IHy presenta una localización más medial (18) lo que colaboraría en la determinación de esta área como una entidad separada del IHy. Respecto al PLH, la PLHLatSubI se encuentra localizada en su porción dorsolateral donde la disposición anatómica de los somas de NEI (oblicuos al eje longitudinal del encéfalo) sigue la dirección de las fibras dopaminérgicas observándose en esta región una intensa distribución de las mismas y relación con los somas que expresan el péptido, mientras que en el resto del PLH la disposición de las neuronas que expresan NEI es más versátil y su relación con las fibras de TH es errática y menos densa.

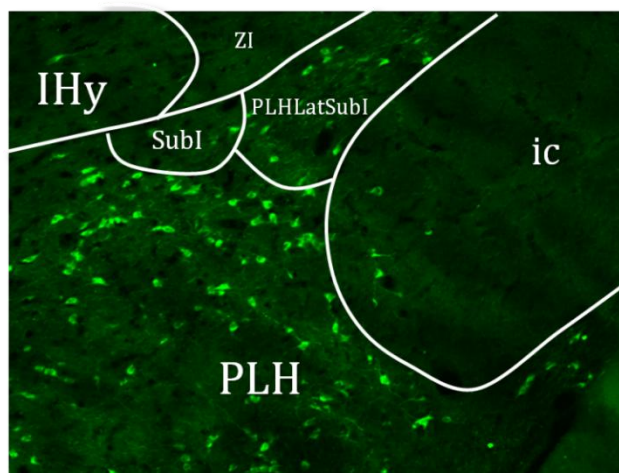


Fig. 47. Representación esquemática de la localización anatómica de la PLHLatSubI en una imagen de IF adquirida aproximadamente a -2.76 mm de distancia al Bregma. En verde se observan las neuronas que expresan NEI. Imagen adquirida a 10x.

Los límites anatómicos exactos y las proyecciones de esta área hacia las diferentes regiones del hipotálamo y el resto del SNC deben ser estudiadas en futuros experimentos; la inyección de marcadores anterógrados y retrógrados permitirá determinar su relación con las demás regiones y confirmar o descartar su pertenencia al IHy o al PLH. Muy posiblemente, por su localización en la intersección entre el hipotálamo y el tálamo y a nivel hipotalámico entre el IHy y el PLH, represente una región integradora.

En cuanto al hipo- e hiperT, si bien la expresión de NEI no se modificó en esta área, la marca de las fibras dopaminérgicas fue menor en el hipoT, mientras que en el hiperT hubo

un aumento del número de botones de TH/soma NEI-ir. Estos resultados indican que el sistema dopaminérgico sería afectado por el déficit o exceso de las THs. En el hiperT se observó que el número de botones dopaminérgicos/soma NEI-ir presentó un incremento, siendo ésta otra de las áreas en las que el hiperT prolongado induciría un remodelado en las terminales y una modificación de la relación de NEI con el sistema dopaminérgico tal como fue demostrado en el IHy rostral.

El presente trabajo demuestra que el neuropéptido EI es regulado de manera compleja en el hipotálamo de la rata. Las distintas áreas donde NEI fue analizado representan regiones principalmente relacionadas al control de la reproducción y de comportamientos tales como el sexual, el control del ciclo vigilia/sueño, la locomoción y la ingesta, entre otros. Además, la mayoría de estas regiones se encuentran interconectadas siendo la regulación de dichas funciones aún más compleja. Otro aspecto importante es que la regulación del péptido es diferente en el macho y en la hembra y que la variación cíclica de los EG y la sensibilidad a los mismos en el hipotálamo femenino es fundamentalmente la razón de la misma; teniendo también en consideración la presencia de áreas sexualmente dimórficas en cada uno. En este trabajo se realizó el análisis de las funciones específicas que NEI podría cumplir en cada una de estas áreas y cómo podría estar regulado en condiciones de eutiroidismo tanto en el macho como en la hembra (**Fig. 48 y 49** respectivamente). La inducción del hipo- y del hiperT permitieron demostrar que tanto el déficit como el exceso de las THs afecta el patrón normal de NEI para cada área hipotalámica y según se trate del macho o la hembra; describiéndose los posibles mecanismos por los que ambas disfunciones ejercerían efectos sobre NEI, así como las posibles consecuencias sobre las acciones en las que el péptido interviene (**Fig. 50 y 51**).

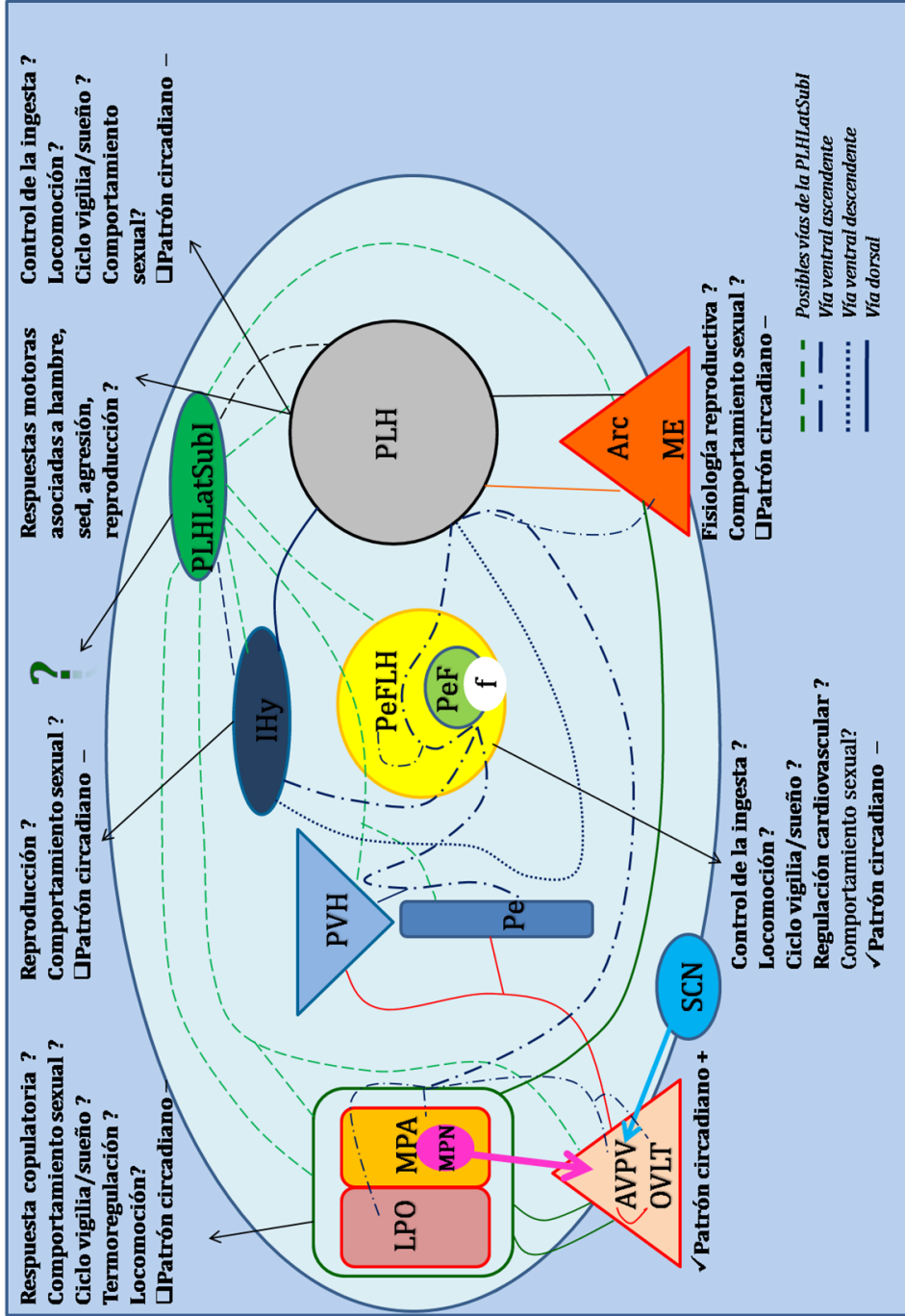


Fig. 48. Representación esquemática de las distintas áreas hipotalámicas que intervienen en la regulación de la reproducción y de comportamientos complejos en las que hay fibras y somas que expresan NEI en la rata macho entiroidea. Se observa cada una de las áreas incluidas en este trabajo, las conexiones entre las mismas representadas por vías aferentes o eferentes y las funciones reguladas por cada una y en las que NEI está o podría estar involucrado. Se señala en cada una la presencia o no de un patrón circadiano de la concentración de NEI.

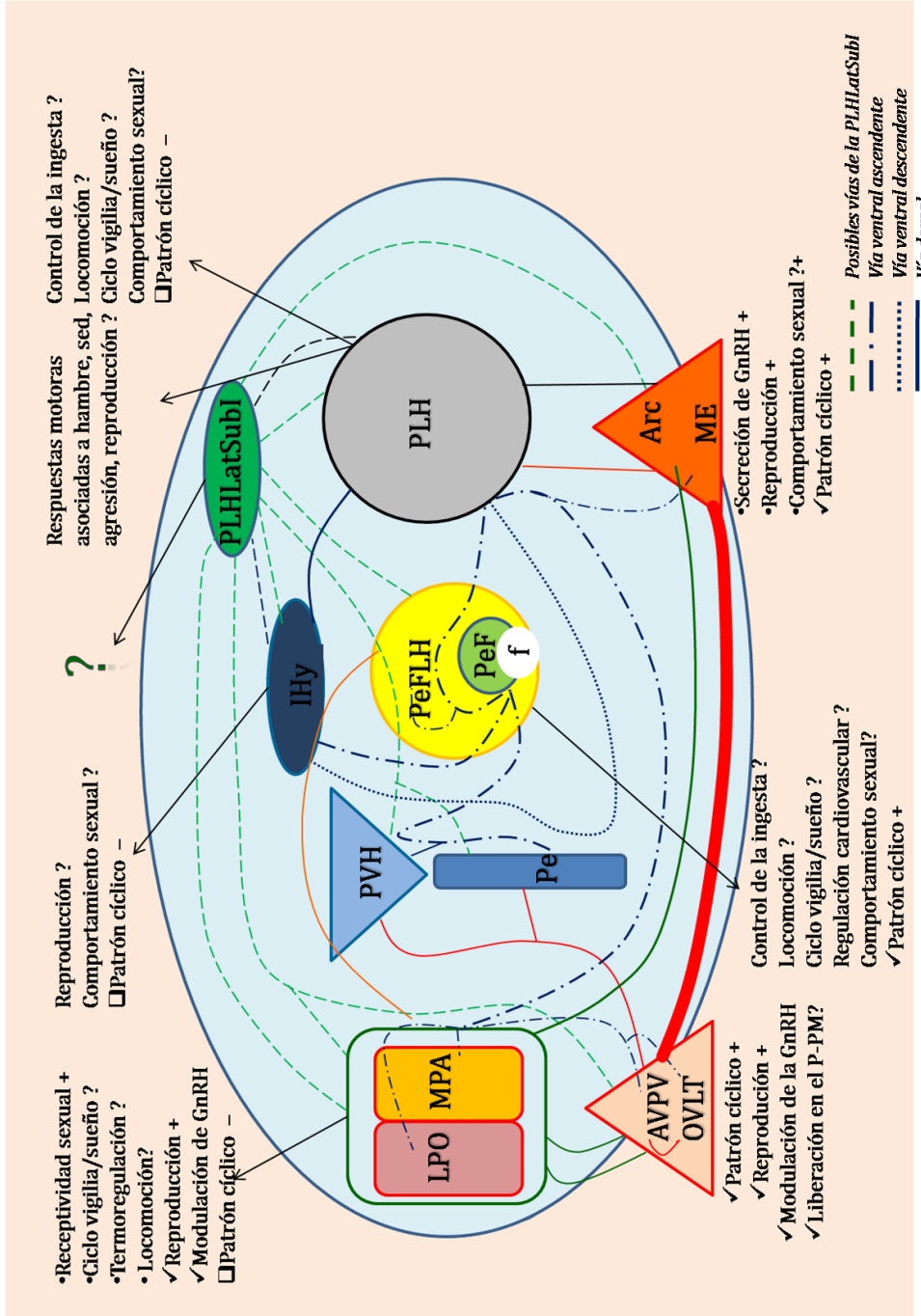


Fig. 49. Representación esquemática de las distintas áreas hipotalámicas que intervienen en la regulación de la reproducción y de comportamientos complejos en las que hay fibras y somas que expresan NEI en la rata hembra eutiroidea. Se observa cada una de las áreas incluidas en este trabajo, las conexiones entre las mismas representadas por vías aferentes o eferentes y las funciones reguladas por cada una, y en las que NEI está o podría estar involucrado. Se señala la presencia o no del patrón cíclico de NEI en cada una de ellas.

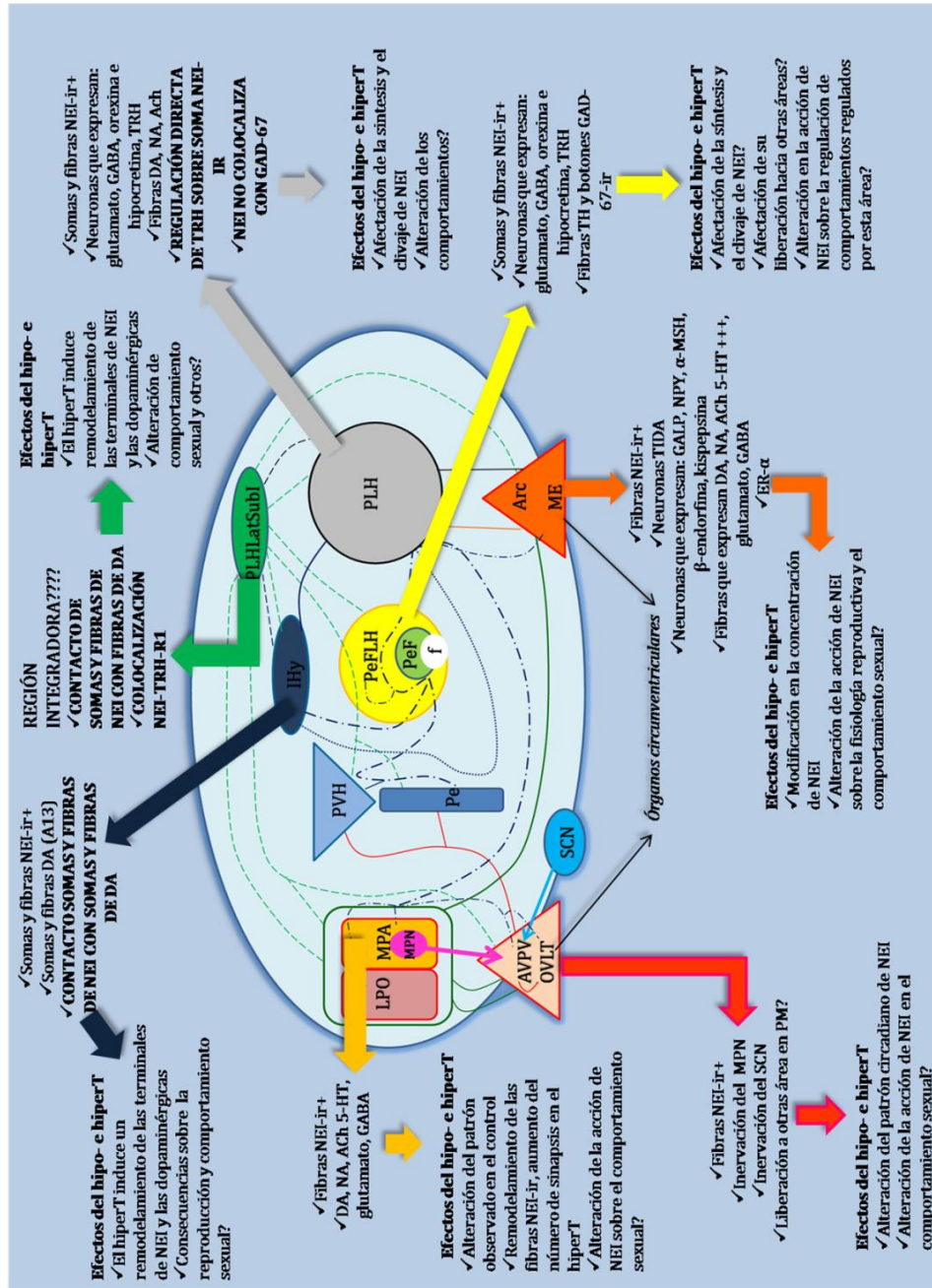


Fig. 51. Representación esquemática de las áreas hipotalámicas estudiadas, sus características principales y el efecto del hipo- e hiperT sobre NEI en la rata macho. Se nombran los componentes fundamentales de cada área y que intervienen en la regulación de las fibras y somas de NEI. Los efectos del hipo- e hiperT sobre el patrón fisiológico de NEI, así como la afectación de la funcionalidad del péptido en la reproducción, en el comportamiento sexual y posiblemente en otros, son tenidos en cuenta.

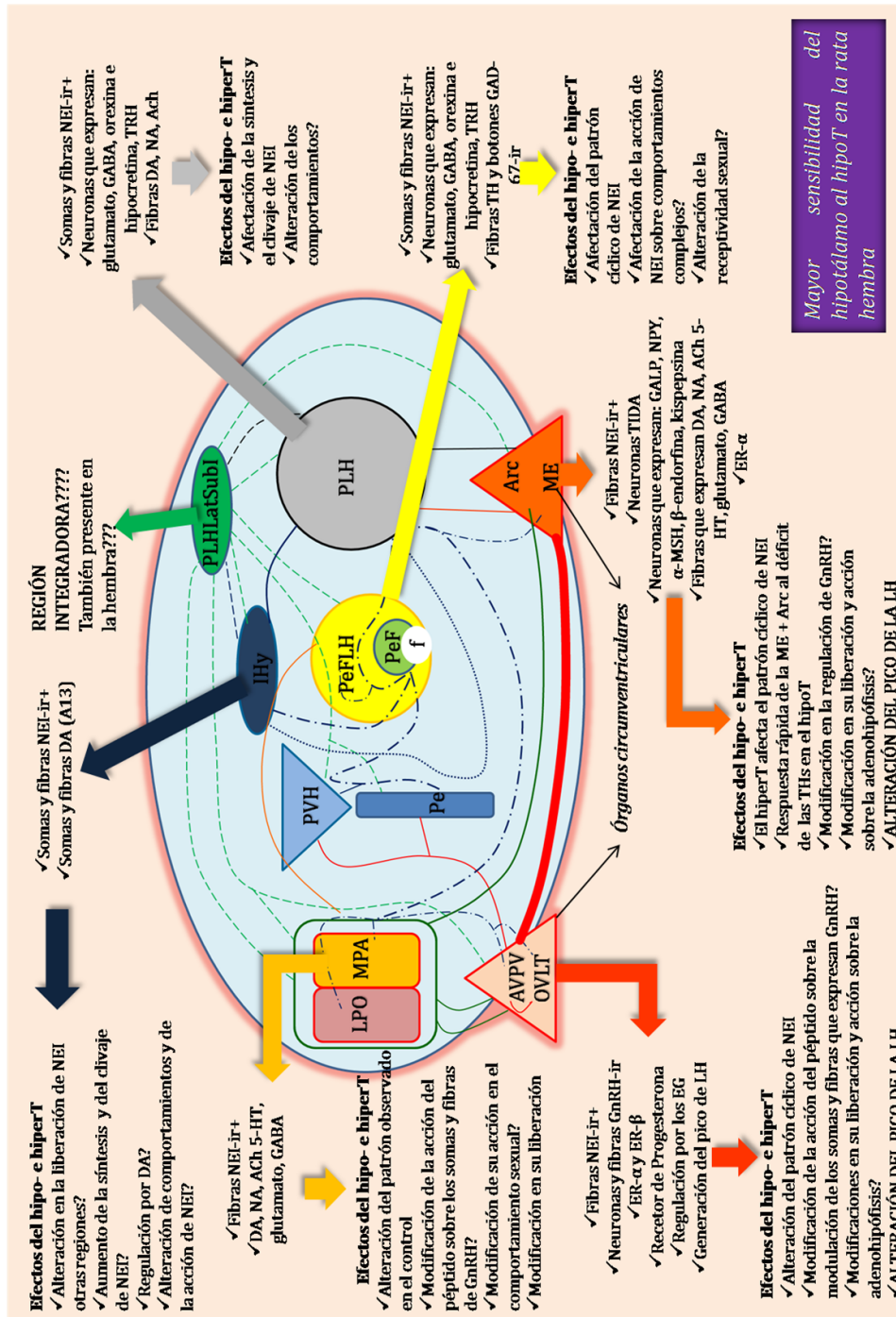


Fig. 51. Representación esquemática de las áreas hipotalámicas estudiadas, sus características principales y el efecto del hipo- e hiperT sobre NEI en la ratona hembra. Se nombran los componentes fundamentales de cada área y que intervienen en la regulación de las fibras y somas de NEI. Los efectos del hipo- y del hiperT sobre el patrón fisiológico de NEI, así como la implicancia de dicha afectación en los mecanismos regulatorios en los que NEI se encuentra y podría estar involucrado, son tenidos en cuenta

Las fibras y los somas que expresan NEI presentan una distribución muy amplia y una intensa relación con otros tipos celulares, neuropéptidos y neurotransmisores. En este trabajo se ha demostrado la estrecha relación de NEI con el sistema dopaminérgico en el IHy y en la PLHLatSubI y la modificación de la misma secundaria a la inducción del hiperT. La relación de NEI con el sistema dopaminérgico ha sido demostrada ampliamente, ya sea a nivel de la acción conjunta en la mediación de ciertos comportamientos (31, 32), como por la presencia de los receptores dopaminérgicos sobre los somas que expresan NEI/MCH, así como su acción sobre éstos (46, 53). La DA interviene en la regulación de funciones complejas como la cognición, la emoción, la percepción, la motivación y la regulación del sueño. La disfunción del sistema dopaminérgico se relaciona a alteraciones en el comportamiento tales como ansiedad, depresión mayor y comportamientos compulsivos (180–182) y disfunción sexual (183). Por lo tanto, la relación de NEI y del sistema dopaminérgico respecto a la afectación de comportamientos complejos observados en el hipo- y en el hipertiroidismo, como el sexual, la depresión, la ansiedad entre otros, deberán ser motivo de futuros estudios. Pudiendo ser el neuropéptido EI uno de los puntos a tener en cuenta en la fisiopatogenia de estos trastornos así como un posible tratamiento de los mismos.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo de tesis permitieron profundizar en la relación entre NEI y el eje HHT, determinando posibles efectos regulatorios de las THs sobre la concentración del péptido y correlacionar los hallazgos principalmente con las alteraciones que a nivel del eje HHG se producen en las patologías tiroideas.

Se pudo determinar que las diferencias en el control hipotalámico y hormonal de la reproducción en machos y hembras influye en la regulación de NEI.

Se demuestra que tanto el déficit como el exceso de las THs son capaces de modificar la concentración del péptido en distintas áreas hipotalámicas y que posiblemente los cambios en la concentración de NEI sean mediados en forma directa por los componentes del eje HHT tales como las THs y la TRH o, indirecta a través de los EG y de otros neuropéptidos y neurotransmisores como la DA y el GABA.

La importancia de estos resultados reside en que posiblemente las alteraciones en la reproducción y a nivel del comportamiento observadas en el hipo- y en el hipertiroidismo puedan ser mediadas por modificaciones en la síntesis, clivaje, liberación y/o degradación de NEI y de su interacción con otras moléculas en el SNC.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA

1. Blanco A. Capítulo 21: Bases Bioquímicas de la Endocrinología. En: Química Biológica, Octava Edición, Ed.: El Ateneo, Buenos Aires. 397-463, 2006.
2. Dickerman S. Neuroendocrinología "El Eslabón Perdido". Rev Médica Hondur. 49: 98-02, 1981.
3. Schally A, Redding T, Bowers C, Barrett J. Isolation and properties of porcine thyrotropin releasing hormone. J Biol Chem. 244: 4077-88, 1969.
4. Boler J, Enzmann F, Foikers K, Bowers C, Schally A. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. Biochem Biophys Res Commun. 37: 705-10, 1969.
5. Burgs R, Dunn T, Desiderio D, Guillemin R. Structure moleculaire du facteur hypophysiotrope TRF d' origine ovine: mise en evidence par spectrométrie de masse de la sequence PCA—His-Pro-NH₂. CR Acad Sel París. 269: 1870-3, 1969.
6. Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th Edition. Ed.: McGraw-Hill, 2012. Disponible en el URL: <http://accessmedicine.com/resourceTOC.aspx?resourceID=4>
7. Viale A, Ortola C, Hervieu G, Furuta M, Barbero P, Steiner DF, Seidah NG, Nahon JL. Cellular localization and role of prohormone convertases in the processing of pro-melanin concentrating hormone in mammals. Biochemistry. 274(10): 6536-45, 1999.
8. Zhou A, Bloomquist B, Mains R. The prohormone convertases PC1 and PC2 mediate distinct endoproteolytic cleavages in a strict temporal order during proopiomelanocortin biosynthetic processing. J Biol Chem. 268(3): 1763-9, 1993.
9. Nillni EA. Regulation of prohormone convertases in hypothalamic neurons: implications for prothyrotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin. Endocrinology. 148(9): 4191-4200, 2007.
10. Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Endocrinology. 147(6): 2705-16, 2006.
11. Nahon J L, Presse F, Vaughan W, Fischer J, Bittencourt JC, Hoeger R, Schoepfer J, Rivier P, Sawchenko WO, Vale A. Characterization of mammalian melanin-concentrating hormones and their precursors. En: Recent Advances in Basic and Clinical Neuroendocrinology. Amsterdam, The Netherlands. Eds.: Casanueva FF & Dieguez; Elsevier Science Publishers. 864: 15-23, 1989.
12. Seidah NG, Chrétien M. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. Biotechnology. 8(5): 602-7, 1997.
13. Nahon J, Presse F, Bittencourt J, Sawchenko W, Viale A. The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral. Endocrinology. 125(4): 2056-65, 1989.

14. Presse F, Nahon J, Fischer W, Vale W. Structure of the human melanin concentrating hormone mRNA. *Mol Endocrinol.* 4(4): 632–7, 1990.
15. Rovere C, Viale A, Nahon J, Kitabgi P. Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin- concentrating hormone in obese fat/fat mice. *Endocrinology.* 137(7):2954–8, 1996.
16. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hibirdization histochemical characterization. *J Comp Neurol.* (319): 218–45, 1992.
17. Skofitsch G, Jacobowitz D, Zamir N. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull.* 15(6): 635–49, 1985.
18. Sita L, Elias C, Bittencourt J. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. *Neuroscience.* 148(4):949–69, 2007.
19. Viale A, Zhixing Y, Breton C, Pedeutour F, Coquerel A, Jordan D, Nahon JL. The melanin-concentrating hormone gene in human: flanking region analysis, fine chromosome mapping, and tissue-specific expression. *Brain Res Mol Brain Res.* 46(46): 243–55, 1997.
20. Stüz AM, Staszkiwicz J, Ptitsyn A, Argyropoulos G. Circadian expression of genes regulating food intake. *Obesity (Silver Spring).* 15(3): 607–15, 2007.
21. Froy O. Metabolism and circadian rhythms--implications for obesity. *Endocr Rev.* 31(1): 1–24, 2010.
22. Parkes D, Vale W. Secretion of melanin-concentrating neuropeptide-EI from cultured rat hypothalamic cells. *Endocrinology.* 131(4): 1826–31, 1992.
23. Nahon J, Presse F, Breton C, Hervieu G, Schorpp M. Structure and regulation of the melanin-concentrating hormone gene. *Ann N Y Acad Sci.* 680: 111-29, 1993.
24. Bittencourt J, Celis ME. Anatomy, function and regulation of neuropeptide EI (NEI). *Peptides.* 29(8):1441–50, 2008.
25. Baker B, Levy A, Hall L, Lightman S. Cloning and expression of melanin-concentrating hormone genes in the rainbow trout brain. *Neuroendocrinology.* 61(1):67–76, 1995.
26. Bittencourt J, Elias C. Melanin-concentrating hormone and neuropeptide EI projections from the lateral hypothalamic area and zona incerta to the medial septal nucleus and spinal cord: a study using multiple neuronal tracers. *Brain Res.* 805(1-2):1–19, 1998.
27. Rondini TA, Donato J Jr, Rodrigues Bde C, Bittencourt JC, Elias CF. Chemical identity and connections of medial preoptic area neurons expressing melanin-concentrating hormone during lactation. *J Chem Neuroanat.* 39(1): 51–62, 2010.
28. Van Leeuwen F, De Raay C, Swaab D, Fisser B. The localization of oxytocin, vasopressin, somatostatin and luteinizing hormone releasing hormone in the rat. *Cell Tissue Res.* 202(2): 189–201, 1979.

29. Huddleston GG, Song CK, Paisley JC, Bartness TJ, Clancy AN. Gonadal steroid receptors colocalize with central nervous system neurons projecting to the rat prostate gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2292(6): R2196-205, 2007.
30. Sanchez M, Baker BI, Celis M. Melanin-concentrating hormone (MCH) antagonizes the effects of α -MSH and neuropeptide E-I on grooming and locomotor activities in the rat. *Peptides.* 18(3):393–6, 1997.
31. Sánchez M, Barontini M, Armando I, Celis M. Correlation of increased grooming behavior and motor activity with alterations in nigrostriatal and mesolimbic catecholamines after α -melanotropin and neuropeptide glutamine-isoleucine injection in the rat ventral tegmental area. *Cell Mol Neurobiol.* 21(5):523–33, 2001.
32. Sánchez-Borzone ME, Attademo A, Baiardi G, Celis ME. Effect of beta-adrenoceptors on the behaviour induced by the neuropeptide glutamic acid isoleucine amide. *Eur J Pharmacol.* 568: 186–91, 2007.
33. Berberian V, Sanchez M, Celis M. Participation of the cholinergic system in the excessive grooming behavior induced by neuropeptide (N) glutamic acid (E) isoleucine (I) amide (NEI). *Neurochem Res.* 27(12): 1713–7, 2002.
34. Sanchez-Borzone M. Tesis Doctoral: El Neuropeptido-EI (NEI): Mecanismo de Interacción con Biomembranas y Sistemas de Neurotransmisión Involucrados en la Expresión de sus Efectos Conductuales, 2009.
35. Gonzalez MI, Baker BI, Hole DR, Wilson CA. Behavioral Effects of Neuropeptide E-I (NEI) in the Female Rat: Interactions with α -MSH, MCH and Dopamine. *Peptides.* 19(6): 1007–16, 1998.
36. Viale A, Kerdelhué B, Nahon JL. 17beta-estradiol regulation of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-E-I contents in cynomolgus monkeys: a preliminary study. *Peptides;* 20(5):553-559, 1999.
37. Murray JF, Hahn JD, Kennedy AR, Small CJ, Bloom SR, Haskell-Luevano C, Coen CW, Wilson CA. Evidence for a stimulatory action of melanin-concentrating hormone on luteinising hormone release involving MCH1 and melanocortin-5 receptors. *J Neuroendocrinol.* 18(3): 157–67, 2006.
38. Attademo A, Sánchez-Borzone M, Lasaga M, Celis M. Intracerebroventricular injection of neuropeptide EI increases serum LH in male and female rats. *Peptides.* 25:1995–9, 2004.
39. Attademo AM, Rondini TA, Rodrigues BC, Bittencourt JC, Celis ME, Elias CF. Neuropeptide glutamic acid-isoleucine may induce luteinizing hormone secretion via multiple pathways. *Neuroendocrinology.* 83: 313–24, 2006.
40. Lee WS, Smith MS, Hoffman GE. Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express Fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:5163–7, 1990.
41. De Paul AL, Attademo AM, Carón RW, Soaje M, Torres AI, Jahn GA, Celis ME. Neuropeptide glutamic-isoleucine (NEI) specifically stimulates the secretory activity of

- gonadotrophs in primary cultures of female rat pituitary cells. *Peptides*. 30: 2081–7, 2009.
42. Rossi M, Choi S, O’Shea D, Miyoshi T, Ghati M, Bloom S. Melanin-Concentrating Hormone Acutely Stimulates Feeding, But Chronic Administration Has No Effect on Body Weight. *Endocrinology*. 138(1): 351–5, 1997.
 43. Maulon-Feraille L, Della Zuana O, Suply T, Rovere-Jovene C, Audinot V, Levens N, Boutin JA, Duhault J, Nahon JL. Appetite-boosting property of pro-melanin-concentrating associated with proteolytic resistance. *J Pharmacol Exp Ther*. 302(2): 766–73, 2002.
 44. Hassani OK, Lee MG, Jones BE. Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(7): 2418–22, 2009.
 45. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A. Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci*. 25(9):2429–33, 2005.
 46. Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides*. 30(11): 2031–9, 2009.
 47. Gao X-B, Van den Pol AN. Melanin-concentrating hormone depresses L-, N-, and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in rat lateral hypothalamic neurons. *J Physiol*. 542(1): 273–86, 2002.
 48. Van den Pol AN, Acuna-Goycolea C, Clark KR, Ghosh PK. Physiological properties of hypothalamic MCH neurons identified with selective expression of reporter gene after recombinant virus infection. *Neuron*. 42(4): 635–52, 2004.
 49. Schwartz MW, Gelling RW. Rats lighten up with MCH antagonist. *Nat Med*. 8(8): 779–81, 2002.
 50. Morton GJ, Mystkowski P, Matsumoto AM, Schwartz MW. Increased hypothalamic melanin concentrating hormone gene expression during energy restriction involves a melanocortin-independent, estrogen-sensitive mechanism. *Peptides*. 25(4): 667–74, 2004.
 51. Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM, Elmquist JK. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci*. 23(18):7143–54, 2003.
 52. Jo YH, Wiedl D, Role LW. Cholinergic modulation of appetite-related synapses in mouse lateral hypothalamic slice. *J Neurosci*. 25(48): 11133–44, 2005.
 53. Conductier G, Nahon J, Guyon A. Dopamine depresses melanin concentrating hormone neuronal activity through multiple effects on α 2-noradrenergic, D1 and D2-like dopaminergic receptors. *Neuroscience*. 178:89–100, 2011.
 54. Wondisford FE, Farr EA, Radovick S, Steinfelder HJ, Moates JM, McClaskey JH, Weintraub BD. Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin β -subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *J Biol Chem*. 264(25): 14601–4, 1989.

55. Madison L, Ahlquist J, Rogers S, Jameson J. Negative regulation of the glycoprotein hormone alpha gene promoter by thyroid hormone: mutagenesis of a proximal receptor binding site preserves transcriptional repression. *Mol Cell Endocrinol.* 94(1): 129–36, 1993.
56. Pennathur S, Madison L, Kay T, Jameson J. Localization of promoter sequences required for thyrotropin-releasing hormone and thyroid hormone responsiveness of the glycoprotein hormone alpha-gene in primary cultures of rat pituitary cells. *Mol Endocrinol.* 7(6): 797–805, 1993.
57. Hollenberg A, Monden T, Flynn T, Boers M, Cohen O, Wondisford F. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol.* 9(5): 540–50, 1995.
58. Lechan RM, Qi Y, Jackson I, Mahdavi V. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 135(1): 92–100, 1994.
59. Celis ME. *Fisiología Humana. Primera Edición.* Córdoba, Ed.: Celis ME, Tomo I, 1999.
60. Hall R, Amos J, Garry R, Buxton R. Thyroid-stimulating Hormone Response to Synthetic Thyrotrophin Releasing Hormone in Man. *Br Med J.* 2(5704): 274–7, 1970.
61. Harris ARC, Christianson D, Smith MS, Fang S, Braverman LE, Vagenakis AG. The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat. *J Clin Invest.* 61:441–8, 1978.
62. Morley J. Extrahypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH): its distribution and its functions. *Life Sci.* 25: 1539–50, 1979.
63. Kennedy AR, Todd JF, Stanley SA, Abbott CR, Small CJ, Ghatei MA, Bloom SR. Melanin-concentrating hormone (MCH) suppresses thyroid stimulating hormone (TSH) release, in vivo and in vitro, via the hypothalamus and the pituitary. *Endocrinology.* 142(7): 3265–8, 2000.
64. Lechan RM, Wu P, Jackson I. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology.* 119(3): 1210–6, 1986.
65. Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science.* 231(4734): 159–61, 1986.
66. Nillni EA, Friedman TC, Todd RB, Birch NP, Loh YP, Jackson IM. Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *J Neurochem.* 65(6):2462–72, 1995.
67. Cruz IP, Nillni EA. Intracellular sites of prothyrotropin-releasing hormone processing. *J Biol Chem.* 271(37): 22736–45, 1996.
68. Schaner P, Todd RB, Seidah NG, Nillni EA. Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J Biol Chem.* 272(32): 19958–68, 1997.

69. Nillni EA, Sevarino KA. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev.* 20(5): 599–648, 1999.
70. Nillni EA. Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 31(2): 134–56, 2010.
71. Liposits Z, Paull W, Wu P, Jackson I, Lechan R. Hypophysiotrophic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons. Ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action. *Histochemistry.* 88(1): 1–10, 1987.
72. Lechan RM, Toni R. Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. In: *Neuroendocrinology.* Ed.: Nemeroff C. 279–330, 1992.
73. Yamada M, Radovick S, Wondisford F, Nakayama Y, Weintraub B, Wilber J. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol.* 4(4): 551–6, 1990.
74. Fliers E, Guldenaar SEF, Wiersinga WM, Swaab DF. Hormone gene expression in patients with nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(12): 4032–6, 1997.
75. Guldenaar SE, Veldkamp B, Bakker O, Wiersinga WM, Swaab DF, Fliers E. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the human hypothalamus. *Brain Res.* 743:93–101, 1996.
76. Sawchenko P, Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 257(3): 275–325, 1982.
77. Toni R, Lechan RM. Neuroendocrine regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the tuberoinfundibular system. *J Endocrinol Invest.* 16(9): 715–53, 1993.
78. Füzési T, Wittmann G, Lechan RM, Liposits Z, Fekete C. Noradrenergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in rats. *Brain Res.* 1294: 38–44, 2009.
79. Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, et al. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest.* 107(1): 111–20, 2001.
80. Perello M, Stuart RC, Vaslet CA, Nillni EA. Cold exposure increases the biosynthesis and proteolytic processing of prothyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus via beta-adrenoreceptors. *Endocrinology.* 148(10): 4952–64, 2007.
81. Fekete C, Liposits Z, Lechan RM. GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res.* 957(2):251–8, 2002.
82. Mihály E, Fekete C, Tatro JB, Liposits Z, Stopa EG, Lechan RM. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and α -melanocyte-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(7): 2596–603, 2000.

83. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 238(4823):78–80, 1987.
84. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 83(6): 835–9, 1995.
85. Dupré SM, Guissouma H, Flamant F, Seugnet I, Scanlan TS, Baxter JD, Samarut J, Demeneix BA, Becker N. Both thyroid hormone receptor (TR) β 1 and TR β 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 145(5): 2337–45, 2004.
86. Cheng S-Y, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 31(2):139–70, 2010.
87. Abel ED, Ahima RS, Boers M, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor β 2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest*. 107(8):1017–23, 2001.
88. Reichlin S. Neural functions of TRH. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*. 276:21–33, 1986.
89. Sharif N. Quantitative autoradiography of TRH receptors in discrete brain regions of different mammalian species. *Ann N Y Acad Sci*. 553: 157–75, 1989.
90. Hinkle P, Shanshala E 2nd. Pituitary thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors: effects of TRH, drugs mimicking TRH action, and chlordiazepoxide. *Mol Endocrinol*. 3(9): 1337–44, 1989.
91. Gershengorn M, Osman R. Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev*. 76(1): 175–91, 1996.
92. Itadani H, Nakamura T, Itoh J, Iwaasa H, Kanatani A, Borkowski J, Ihara M, Ohta M. Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 250(1): 68–71, 1998.
93. Cao J, O'Donnell D, Vu H, Payza K, Pou C, Godbout C, Jakob A, Pelletier M, Lembo P, Ahmad S, Walker P. Cloning and characterization cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*. 273(48):32281–7, 1998.
94. Sun Y, Lu X, Gershengorn MC. G-protein-coupled receptor signalling in neuroendocrine systems: Thyrotropin-releasing hormone receptors—similarities and differences. *J Mol Endocrinol*. 30: 87–97, 2003.
95. Calzá L, Giardino L, Ceccatelli S, Zanni M, Elde R, Hökfelt T. Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*. 51(4): 891–909, 1992.
96. Zabavnik J, Arbuthnott G, Eidne KA. Distribution of thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain. *Neuroscience*. 53 (3): 877-87, 1993.

97. Heuer H, Schäfer M, O'Donnell D, Walker P, Bauer K. Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol.* 428(2): 319–36, 2000.
98. Wiens SC, Trudeau VL. Thyroid hormone and gamma-aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 144(3): 332–44, 2006.
99. Bernal J, Guadaño-Ferraz A, Morte B. Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid.* 13(11): 1005–12, 2003.
100. Courtin F, Zrouri H, Lamirand A, Li WW, Mercier G, Schumacher M, Goascogne CL, Pierre M. Thyroid hormone deiodinases in the central and peripheral nervous system. *Thyroid.* 15(8): 931–42, 2005.
101. Bono G, Fancellu R, Blandini F, Santoro G, Mauri M. Cognitive and affective status in mild hypothyroidism and interactions with L-thyroxine treatment. *Acta Neurol Scand.* 110(1): 59-66, 2004.
102. Davis JD, Tremont G. Neuropsychiatric aspects of hypothyroidism and treatment reversibility. *Minerva Endocrinol.* 32(1): 49-65, 2007
103. Doufas a G, Mastorakos G. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the female reproductive system. *Ann N Y Acad Sci.* 900: 65–76, 2000.
104. Krassas GE, Poppe K, Glinoeer D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev.* 31(5): 702-55, 2010.
105. Carani C, Isidori AM, Granata A, Carosa E, Maggi M, Lenzi A, Jannini EA. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(12): 6472-9, 2005.
106. Singh R, Hamada A J, Agarwal A. Thyroid Hormones in Male Reproduction and Fertility. *The Open Reproductive Science Journal.* 3: 98-104, 2011.
107. Zhang SS, Carrillo a J, Darling DS. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 3(7): 555–62, 1997.
108. Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(12): 4835–40, 2000.
109. Hagino N. Influence of hypothyroid state on ovulation in rats. *Endocrinology.* 88(6): 1332–6, 1971.
110. Ortega E, Osorio A, Ruiz E. Inhibition of 5'DI and 5'DII L-tiroxine (T4) monodeiodinases. Effect on the hypothalamo-pituitary ovarian axis in adult hypothyroid rats treated with T4. *Biochem Mol Biol Int.* 39(4):853–60, 1996.
111. Grassi G, Balsamo A, Ansaldi C, Balbo A, Massobrio M, Benedetto C. Thyroid autoimmunity and infertility. *Gynecol Endocrinol.* 15(5):389–96, 2001.
112. Tohei A. Studies on the functional relationship between thyroid, adrenal and gonadal hormones. *J Reprod Dev.* 50(1):9–20, 2004.

113. Parrot M, Johnston M, Durbin P. The effects of thyroid and parathyroid deficiency on reproduction in the rat. *Endocrinology*. 67: 467–83, 1960.
114. Hapon MB, Simoncini M, Via G, Jahn GA. Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction*. 126: 371–82, 2003.
115. Weiss SR, Burns JM. The effect of acute treatment with two goitrogens on plasma thyroid hormones, testosterone and testicular morphology in adult male rats. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 90(3):449-52, 1988.
116. Chattopadhyay S, Choudhury S, Roy A, Chainy GB, Samanta L. T₃ fails to restore mitochondrial thiol redox status altered by experimental hypothyroidism in rat testis. *Gen Comp Endocrinol*. 169(1): 39-47, 2010.
117. Becks G, Burrow G. Thyroid disease and pregnancy. *Med Clin North Am*. 75(1):121–50, 1991.
118. Bauer M, Heinz A, Whybrow PC. Thyroid hormones, serotonin and mood : of synergy and significance in the adult brain. *Mol Psychiatry*. 7(2): 140–56, 2002.
119. Joffe R, Sokolov S. Thyroid hormones, the brain, and affective disorders. *Crit Rev Neurobiol*. 8: 45–63, 1994.
120. Simon NM, Blacker D, Korbly NB, Sharma SG, Worthington JJ, Otto MW, Pollack MH. Hypothyroidism and hyperthyroidism in anxiety disorders revisited: new data and literature review. *J Affect Disord*. 69(1-3): 209–17, 2002.
121. Kundu S, Pramanik M, Roy S, De J, Biswas A, Ray AK. Maintenance of brain thyroid hormone level during peripheral hypothyroid condition in adult rat. *Life Sci*. 79(15):1450–5, 2006.
122. Kundu S, Roy S, De J, Biswas A, Pramanik M, Ray AK. Maintenance of homeostasis for thyroid hormone in the adult rat brain: possible involvement of a nuclear-mediated phenomenon. *Neuroendocrinology*. 86(2): 94-103, 2007.
123. Kundu S, Biswas A, Roy S, De J, Pramanik M, Ray AK. Thyroid hormone homeostasis in brain: possible involvement of adrenergic phenomenon in adult rat. *Neuroendocrinology*. 89(2): 140-51, 2009.
124. Kundu S, Roy S, Biswas A, De J, Pramanik M, Ray AK. Possible Influence of Dopaminergic Receptor in Maintenance of Thyroid Hormone Homeostasis: A Study in Adult Rat Brain. *J Endocrinol Metab*. 2(3): 128-134, 2012.
125. Diez D, Grijota-Martinez C, Agretti P, De Marco G, Tonacchera M, Pinchera A, de Escobar GM, Bernal J, Morte B. Thyroid hormone action in the adult brain: gene expression profiling of the effects of single and multiple doses of triiodo-L-thyronine in the rat striatum. *Endocrinology*. 149(8): 3989-4000, 2008.
126. Claustre J, Balende C, Pujol JF. Influence of the thyroid hormone status on tyrosine hydroxylase in central and peripheral catecholaminergic structures. *Neurochem Int*. 28(3): 277–81, 1996.

127. Harthoorn LF, Sañé A, Nethe M, Van Heerikhuize JJ, Sa A. Multi-transcriptional profiling of melanin-concentrating hormone and orexin-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 25(8): 1209–23, 2005.
128. Upadhyaya L, Agrawal J. Effect of L-thyroxine and carbimazole on brain biogenic amines and amino acids in rats. *Endocr Res.* 19(2-3): 87–99, 1993.
129. Kalaria R, Prince A. Decreased neurotransmitter receptor binding in striatum and cortex from adult hypothyroid rats. *Brain Res.* 364(2): 268–74, 1986.
130. Chatterjee A, Dalal B, Sadhu U. Hormone mediated changes of brain glutamic acid system in amino acid imbalance. *Horm Metab Res.* 21(3):116–9, 1989.
131. Hapon MB, Varas SM, Jahn GA, Giménez MS. Effects of hypothyroidism on mammary and liver lipid metabolism in virgin and late-pregnant rats. *J Lipid Res.* 46(6):1320-30, 2005.
132. Rosato R, Jammes H, Jahn G. Effect of chronic thyroxine treatment on pregnancy in rats: effects on oestrogen, progesterone, prolactin and GH receptors in uterus, liver and mammary gland. *Endocr Res.* 24(2):269–84, 1998.
133. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology.* 62(4A): 609–14, 2002.
134. Ayala C, Valdez SR, Navarra Morero ML, et al. Hypo- and hyperthyroidism affect NEI concentration in discrete brain areas of adult male rats. *Peptides.* 32:1249–54, 2011.
135. Paxinos G, Watson C. *Atlas: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* 7th Edition, London. Publisher: Elsevier Inc, 2007.
136. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 32:9–15, 1994.
137. Paxinos G, Watson C. *Atlas: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates-Compact Sixth Edition.* 6th Edition. London. Publisher: Elsevier Inc, 2009.
138. Freeman, M. *The Physiology of Reproduction.* Eds.: Knobi Le and Neill J. pp. 613–658, Raven Press, 1994.
139. Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *J Neuroendocrinol.* 21(4):410-4, 2009.
140. Simerly RB, Chang C, Muramatsu M, Swanson LW. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 294(1):76-95, 1990.
141. Simerly RB. Organization and regulation of sexually dimorphic neuroendocrine pathways. *Behav Brain Res.* 92(2):195-203, 1998.
142. Simerly RB, Carr AM, Zee MC, Lorang D. Ovarian steroid regulation of estrogen and progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the anteroventral periventricular nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol.* 8(1): 45-56, 1996.
143. Polston EK, Simerly RB. Ontogeny of the projections from the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus in the female rat. *J Comp Neurol.* 495(1): 122-32, 2006.

144. Prevot V, Bellefontaine N, Baroncini M, Sharif A, Hanchate NK, Parkash J, Campagne C, de Seranno S. Gonadotrophin-releasing hormone nerve terminals, tanycytes and neurohaemal junction remodelling in the adult median eminence: functional consequences for reproduction and dynamic role of vascular endothelial cells. *J Neuroendocrinol.* 22(7):639-49, 2010.
145. Prevot V. GnRH neurons directly listen to the periphery. *Endocrinology.* 152(10):3589-91, 2011.
146. Barry J. Recent data concerning hypothalamic regulation of gonadotropin secretion from the anterior pituitary gland. *Gynecologie.* 24(2):173-7, 1973.
147. Gross DS. Distribution of gonadotropin-releasing hormone in the mouse brain as revealed by immunohistochemistry. *Endocrinology.* 98(6):1408-17, 1976.
148. Herde MK, Geist K, Campbell RE, Herbison AE. Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology.* 152(10):3832-41, 2011.
149. Polston EK, Gu G, Simerly RB. Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience.* 123(3): 793-803, 2004.
150. Alam MN, Mallick BN. Role of lateral preoptic area alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors in sleep-wakefulness and body temperature regulation. *Brain Res Bull.* 35(2): 171-7, 1994.
151. Schmidt MH, Valatx JL, Sakai K, Fort P, Jouvet M. Role of the lateral preoptic area in sleep-related erectile mechanisms and sleep generation in the rat. *J Neurosci.* 20(17): 6640-7, 2000.
152. Benedetto L, Rodriguez-Servetti Z, Lagos P, D'Almeida V, Monti JM, Torterolo P. Microinjection of melanin concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. *Peptides.* 39:11-5, 2013.
153. Dominguez JM, Gil M, Hull EM. Preoptic glutamate facilitates male sexual behavior. *J Neurosci.* 26(6): 1699-703, 2006
154. Hull EM, Muschamp JW, Sato S. Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol Behav.* 83(2): 291-307, 2004.
155. Chiocchio SR, Gallardo MG, Louzan P, Gutnisky V, Tramezzani JH. Melanin-concentrating hormone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone and gonadotropins in the female rat acting at both median eminence and pituitary levels. *Biol Reprod.* 64(5): 1466-72, 2001.
156. Bittencourt JC. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. *Gen Comp Endocrinol.* 172(2):185-97, 2011.
157. Meister B. Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 92(1-2): 263-71, 2007.
158. Lyons DJ, Horjales-Araujo E, Broberger C. Synchronized network oscillations in rat tuberoinfundibular dopamine neurons: switch to tonic discharge by thyrotropin-releasing hormone. *Neuron.* 65(2): 217-29, 2010.

159. Crown A, Clifton DK, Steiner RA. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology*. 86(3): 175-82, 2007.
160. Patisaul HB, Fortino AE, Polston EK. Sex differences in serotonergic but not gamma-aminobutyric acidergic (GABA) projections to the rat ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*. 149(1): 397-408, 2008.
161. Freeman ME, LaRochelle FT Jr, Moore RB. Effect of thyroid status on spontaneous and induced surges of luteinizing hormone. *Endocrinology*. 99(3): 713-9, 1976.
162. Garcia-Segura LM, Lorenz B, DonCarlos LL. The role of glia in the hypothalamus: implications for gonadal steroid feedback and reproductive neuroendocrine output. *Reproduction*. 135(4): 419-29, 2008.
163. Mohácsik P, Zeöld A, Bianco AC, Gereben B. Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target. *J Thyroid Res*. 2011;215718, 2011.
164. Sita LV, Elias CF, Bittencourt JC. Dopamine and melanin-concentrating hormone neurons are distinct populations in the rat rostromedial zona incerta. *Brain Res*. 970(1-2): 232-7, 2003.
165. Li FW, Deurveilher S, Semba K. Behavioural and neuronal activation after microinjections of AMPA and NMDA into the perifornical lateral hypothalamus in rats. *Behav Brain Res*. 224(2):376-86, 2011.
166. Abrahamson EE, Moore RY. The posterior hypothalamic area: chemoarchitecture and afferent connections. *Brain Res*. 889(1-2):1-22, 2001.
167. 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*. 92(4):573-85, 1998.
168. Sinnamon HM, Karvosky ME, Ilch CP. Locomotion and head scanning initiated by hypothalamic stimulation are inversely related. *Ann N Y Acad Sci*. 860:560-2, 1998.
169. Stock G, Rupprecht U, Stumpf H, Schlör KH. Cardiovascular changes during arousal elicited by stimulation of amygdala, hypothalamus and locus coeruleus. *J Auton Nerv Syst*. 3(2-4):503-10, 1981.
170. Alam MN, Gong H, Alam T, Jaganath R, McGinty D, Szymusiak R. Sleep-waking discharge patterns of neurons recorded in the rat perifornical lateral hypothalamic area *J Physiol*. 538(Pt 2):619-31, 2002.
171. Marson L, Murphy AZ. Identification of neural circuits involved in female genital responses in the rat: a dual virus and anterograde tracing study. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 291(2):R419-28, 2006.
172. Jirikowski GF, Caldwell JD, Stumpf WE, Pedersen CA. Estradiol influences oxytocin immunoreactive brain systems. *Neuroscience*. 25: 237-248, 1988.
173. von Economo C. Sleep as a problem of localization *J Nerv Ment Dis*. 71, 249-259, 1930.

174. Swanson LW. The hypothalamus. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy. Amsterdam. Ed.: Elsevier, Eds.: Bjorklund A, Hokfelt T, Swanson LW. 5: 1–124, 1987.
175. Bernardis LL, Bellinger LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20: 189–287, 1996.
176. Harthoorn LF. Projection-dependent differentiation of melanin-concentrating hormone-containing neurons. *Cell Mol Neurobiol.* 27(1): 49-55, 2007.
177. Espinosa VP, Ferrini M, Shen X, Lutfy K, Nillni EA, Friedman TC. Cellular colocalization and coregulation between hypothalamic pro-TRH and prohormone convertases in hypothyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(1): E175-86, 2007.
178. Elias CF, Sita LV, Zambon BK, Oliveira ER, Vasconcelos LA, Bittencourt JC. Melanin-concentrating hormone projections to areas involved in somatomotor responses. *J Chem Neuroanat.* 35(2):188-201, 2008.
179. Zhang X, van den Pol AN. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) inhibits melanin-concentrating hormone neurons: implications for TRH-mediated anorexic and arousal actions. *J Neurosci.* 32(9):3032-43, 2012.
180. Fineberg NA, Krishnaiah RB, Moberg J, O'Doherty C. Clinical screening for obsessive-compulsive and related disorders. *Israel J Psychiatry Relat Sci.* 45:151–163, 2008.
181. Fink M, Akimova E, Spindelegger C, Hahn A, Lanzenberger R, Kasper S. Social anxiety disorder: Epidemiology, biology and treatment. *Psychiatr Danubina.* 21:533–542, 2009.
182. Cousins DA, Butts K, Young AH. The role of dopamine in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* 11:787–806, 2009.
183. Baskerville TA, Douglas AJ. Dopamine and oxytocin interactions underlying behaviors: potential contributions to behavioral disorders. *CNS Neurosci Ther.* 16(3): e92-123, 2010.