

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) del núcleo paraventricular hipotalámico y sistema límbico como reguladora de la homeostasis energética y de la conducta alimentaria en animales con ayuno, restricción alimentaria y anorexia

Patricia de Gortari,¹ María Elena González-Alzati,¹ Lorraine Jaimes-Hoy,¹ Aimee Estrada,¹ Karen Mancera,¹ Cinthia García-Luna,¹ María Isabel Amaya¹

Artículo original

SUMMARY

TRH expression and release from hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) change with environmental stimuli. Fasted and food-restricted animals present decreased TRH synthesis and release, decelerating metabolic rate and utilization of energy stores, which is an advantageous adaptation of animals with nutrient deficit. Comparing thyroid axis function between prepubertal vs. adult male fasted animals, we found a greater body weight reduction than in adults (30% vs. 11%) and TRH release was not decreased; TRH degradation by pituitary PPII enzyme decreased, which maintained energy waste. TRH content of fasted-prepubertal animals changed in hippocampus and nucleus accumbens, and in amygdala of adults vs. *ad libitum* fed animals. PVN TRH role in food-avoiding behavior was studied by comparing its expression levels and of adolescent, adult females and male animals with anorexic conduct when drinking 2.5% of NaCl solution (AN) vs. a group forced to ingest the amount of food consumed by AN (FFR); also vs. a control group fed *ad libitum* (C). PVN TRH mRNA and TSH serum levels increased in AN vs. C; both decreased in FFR, supporting the putative anorexigenic role for the peptide. TRH content differentially changed in hippocampus and in frontal cortex of AN and FFR, suggesting its participation in taste perception and memory association. Orexinergic and NPYergic pathways are inactive in anorexic animals. Blocking corticotrophin-releasing hormone signal by an antagonist of CRH-R2 in the PVN reverses TRH high expression and TSH serum levels in AN.

Key words: TRH, anorexia, feeding, amygdala, hippocampus, nucleus accumbens.

RESUMEN

La expresión y liberación de la TRH del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) cambia con estímulos ambientales; en ayuno y restricción de alimentos la liberación del péptido disminuye, reduciéndose la tasa del metabolismo y la degradación de reservas energéticas. Esto es una adaptación ventajosa para los animales con balance negativo de energía. Al comparar el contenido de TRH en la eminencia media entre animales prepúberes y adultos en ayuno de 48 horas, observamos que los jóvenes no tienen una adaptación al déficit de nutrimentos. Su peso baja más que en adultos (30% vs. 11%) y la liberación de TRH no disminuye; la degradación de TRH por PPII en la adenohipófisis (PPII) disminuye, manteniéndose el gasto energético. El contenido de TRH de animales prepúberes en ayuno cambió en el hipocampo y en el núcleo *accumbens*, así como en la amígdala de los adultos comparado contra los animales con alimentación *ad libitum*.

La TRH se ha propuesto como agente anorexigénico. Evaluamos su contenido y expresión en el NPV de animales que evitan el alimento al beber una solución de NaCl (2.5%)(AN), en otros con restricción de alimento forzada (RAF) que ingieren la misma cantidad que AN y en aquellos (C) con alimentación *ad libitum*. La síntesis de TRH en el NPV y el contenido sérico de TSH disminuyen en RAF pero aumentan en AN. La vía orexinérgica y la de NPY de AN están inactivas. La inyección de un antagonista a CRH revierte las alteraciones de TRH y TSH y atenúa la anorexia de AN.

Palabras clave: TRH, anorexia, conducta alimentaria, amígdala, hipocampo, núcleo *accumbens*.

¹ Laboratorio de Neurofisiología Molecular de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Correspondencia: Dra. Patricia de Gortari. Laboratorio de Neurofisiología Molecular de la Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370, México, DF. Tel: 4160-5057. E-mail: gortari@imp.edu.mx

INTRODUCCIÓN

Al conjunto de procesos que promueven la ingestión de alimentos se le denomina conducta alimentaria. Esta conducta es motivacional, lo que significa que depende de la presencia de diferentes estímulos externos e internos que al ser integrados provocan que los animales diseñen estrategias y se muevan para buscar alimentos. Uno de los principales estímulos internos es la percepción de alimentos en el aparato digestivo. La distensión intestinal provoca la liberación de péptidos gástricos tales como grelina y colecistoquinina, que a través de conexiones aferentes al nervio vago son capaces de informar al cerebro sobre la disponibilidad que tiene el organismo de nutrimentos. Dependiendo del tamaño y volumen de las reservas energéticas, los adipocitos y el páncreas liberan dos hormonas, la leptina e insulina respectivamente; éstas viajan a través de la circulación y penetran la barrera hematoencefálica al nivel de la eminencia media (EM) y del núcleo del tracto solitario (NTS). Así, informan al cerebro sobre el estado del balance energético del organismo.¹

La idea o representación espontánea de un alimento en particular en un momento dado se debe y se traduce en señales neuronales que se consideran internas. Estas ideas se han asociado a estados de ánimo positivos y a la función de regiones cerebrales del sistema límbico, como la amígdala, el hipocampo y el núcleo *accumbens*.² En particular, a este último se le ha involucrado con los mecanismos de recompensa que provocan el uso de drogas pero también el consumo de alimentos.³ La urgencia o motivación con que se busca un alimento cuyo consumo se ha asociado a estados de ánimo positivos termina al ser ingerido.

Las características sensoriales de los alimentos, olor, sabor, textura, apariencia, etc., son algunos de los estímulos externos que promueven o inhiben la conducta alimentaria. Estos son percibidos por receptores específicos en neuronas de la corteza prefrontal e insular, que son regiones donde esta información se procesa y puede almacenarse como positiva o negativa.⁴ Además, entre otros de los estímulos externos se encuentran las situaciones ambientales, como los cambios de temperatura que disparan mecanismos para mantener el equilibrio en el organismo activando la degradación de reservas energéticas.⁵ Las situaciones estresantes que también demandan energía son otros estímulos externos que provocan en los animales cambios en su conducta alimentaria.⁶⁻⁸

En el cerebro, el hipotálamo es la región que en última instancia está involucrada en la recepción e integración de todas estas señales, tanto periféricas como centrales. Una vez decodificadas y tras la discriminación de la jerarquía de esas señales, el núcleo paraventricular (NPV) hipotalámico es capaz de dar respuesta a las necesidades de energía cambiantes del organismo, modulando la velocidad de la tasa metabólica.⁹⁻¹¹

El NPV contiene neuronas que se denominan hipofisiotrópicas puesto que sintetizan péptidos cuya exclusiva función es la de regular los ejes neuroendocrinos: el eje hi-

potálamo-hipófisis-tiroideo (HHT) dirigido por la hormona liberadora de tiotropina (TRH), el hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), cuya regulación depende de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y también el hipotálamo-hipófisis-gonadal.^{12,13}

La TRH es un tripéptido (pyro-glu-his-proNH₂) que fue aislado de hipotálamos de ovejas por Boler *et al.*, 1969;¹⁴ Burgos *et al.*, 1969.¹⁵ Fue, de hecho, el primer factor hipotalámico purificado y estudiado. Las neuronas que lo sintetizan en la región parvocelular de la parte medial del NPV tienen proyecciones exclusivamente hacia la eminencia media de donde la TRH es liberada a la circulación porta-hipofisiaria.^{16,17} Una vez ahí, y a través de sus receptores TRH-R1 enriquecidos en la adenohipófisis, actúa sobre los tiotropos induciendo la liberación de tiotropina (TSH) o en los lactotropos estimulando la síntesis y liberación de prolactina. El tejido blanco de la TSH es la glándula tiroidea donde induce la liberación de hormonas tiroideas (HT): triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄).^{18,19}

Las HT actúan sobre diferentes órganos, sin embargo, es particularmente importante mencionar que participan en la regulación de vías como la glucólisis, gluconeogénesis, lipólisis, lipogénesis, síntesis de proteínas, así como de la termogénesis. Por esto son relevantes para el mantenimiento de la homeostasis energética.²⁰

No es sorpresivo, entonces, que el control de la concentración sérica de las HT sea particularmente estricto. En condiciones de hipotiroidismo, la transcripción del gen de TRH en el NPV y de TSH en la adenohipófisis se des-reprime, aumentándose su síntesis, liberación y el contenido sérico de HT. Por el contrario, en el hipertiroidismo, T₃ que es la hormona activa, unida a su receptor citoplasmático se transporta al núcleo y uniéndose a la región promotora del gen de TRH en neuronas del NPV y células de TSH en la adenohipófisis, inhibe la transcripción de ambos. Este tipo de regulación del eje se conoce como retroalimentación negativa.²¹⁻²³

El proceso de degradación de TRH en la circulación portal una vez que ha activado a su receptor en la adenohipófisis también parece estar regulado, aunque el entendimiento de este paso no ha sido del todo clarificado. La degradación de TRH es efectuada por la ectoenzima membranal adenohipofisiaria piroglutamil aminopeptidasa II (PPII). La actividad y síntesis de la PPII aumenta en condiciones de hipertiroidismo, mientras que disminuye con bajas concentraciones de HT y elevación de la de estrógenos en el suero.^{24,25} Estos hallazgos han sugerido que la PPII participa en la regulación del funcionamiento del eje tiroideo por lo que diversos estudios han tenido como objetivo definir su importancia en la homeostasis energética.

La expresión de TRH en las neuronas hipofisiotrópicas del NPV se encuentra regulada no sólo por T₃ sino también por algunas de las señales periféricas que mantienen la homeostasis energética, como la leptina y la insulina. Estas tienen receptores en las neuronas TRHérgicas del NPV y por tanto pueden afectar directamente la síntesis del péptido.

Además cuentan con receptores en dos poblaciones neuronales de otro núcleo hipotalámico que regula la conducta alimentaria, el núcleo arqueado (ARC).^{26,27} Una de estas poblaciones sintetiza y libera hacia el NPV dos péptidos orexigénicos (que activan la conducta alimentaria): el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada al agouti (AgRP); la disminución del contenido sérico de leptina activa la síntesis de dichos péptidos. La otra población neuronal del núcleo arqueado sintetiza dos neuropéptidos que tienen funciones anorexigénicas, es decir, que inhiben la conducta alimentaria (el transcrito regulado por anfetaminas y por cocaína, CART y la pro-opiomelanocortina POMC), y que son activados por las hormonas leptina e insulina. Las neuronas TRHérgicas del NPV coexpresan receptores para estos cuatro péptidos, por lo que la acción de la insulina sobre la síntesis de TRH también puede ser a través de su acción sobre el núcleo arqueado.²⁸⁻³⁴

Los péptidos anorexigénicos CART, POMC y las hormonas con acciones catabólicas como la leptina e insulina activan la síntesis de TRH en el NPV, mientras que aquéllos con funciones orexigénicas la inhiben. Por estas evidencias, a la TRH se le considera como un inhibidor de la conducta alimentaria.^{28,32,33}

Diferentes condiciones ambientales que afectan la homeostasis energética como el estrés, el ayuno, la desnutrición y los cambios de temperatura modifican la expresión de esta hormona.

Ayuno y desnutrición.³⁵ El déficit de nutrientes reta el funcionamiento del eje HHT. La disminución de peso de los animales se ha asociado a un hipotiroidismo adaptativo; es decir, si la re-alimentación se presenta, el contenido sérico de las HT regresa a niveles basales. A pesar del desarrollo de esta condición de hipotiroidismo, la expresión de TRH en el NPV no se encuentra elevada, como se hubiera esperado. De hecho, los animales adultos con un ayuno de 48 h presentan disminución en la síntesis del péptido;³⁶ no sólo es la síntesis del péptido la que está alterada, sino que en una restricción de alimentos con una reducción de un tercio de su requerimiento con respecto al consumo *ad libitum* de ra-

tas, la liberación de TRH es menor.^{37,38} Esto puede detectarse al medir su contenido por radioinmunoensayo (RIA) en la EM que son las terminales nerviosas donde el péptido se acumula antes de su liberación: si está disminuido en la EM, se interpreta como que se está liberando y, por el contrario, si está aumentado, se infiere inhibición de la liberación. Esto puede corroborarse porque la acumulación de TRH en la EM debe asociarse a un menor contenido sérico de TSH.

Con estos antecedentes comparamos los cambios provocados por el ayuno de 48 h en el funcionamiento del eje tiroideo entre ratas adultas y prepúberes (de 28 días de edad), así como con ratas macho con una desnutrición por siete semanas en las que los animales sólo consumieron 50% de sus requerimientos. Uno de los objetivos principales fue el de definir si la actividad de la enzima adenohipofisiaria PPII, que degrada a la TRH una vez que ésta es liberada hacia la circulación portal, estaría modificada en condiciones de ayuno y desnutrición. Esto apoyaría un papel regulatorio de la PPII sobre la función de TRH en condiciones de déficit de energía. Así, evaluamos el contenido de TRH en la EM y en el resto del hipotálamo por RIA, de TSH en el suero también por RIA y la actividad de la PPII en la adenohipófisis por medio de un ensayo fluorométrico.³⁵

Encontramos que la pérdida de peso corporal de los animales prepúberes después del ayuno (30%) fue más drástica que la de los adultos ayunados (11%) o con desnutrición comparando contra sus respectivos controles (100%) que fueron mantenidos con alimentación *ad libitum*. Esto pudo tener relación con la mayor liberación de TRH de la EM de ratas prepúberes (menor acumulación) que coincidió con un contenido sérico de TSH y disminución de la actividad de la enzima PPII en la adenohipófisis. Los resultados contrastaron con los de las ratas adultas en ayuno y con desnutrición por siete semanas que presentaron los datos que se habían descrito en la bibliografía: menor liberación de TRH de la EM, menor concentración sérica de TSH y el dato nuevo para ese momento fue que la actividad de la PPII no se modificó en este paradigma (figura 1).

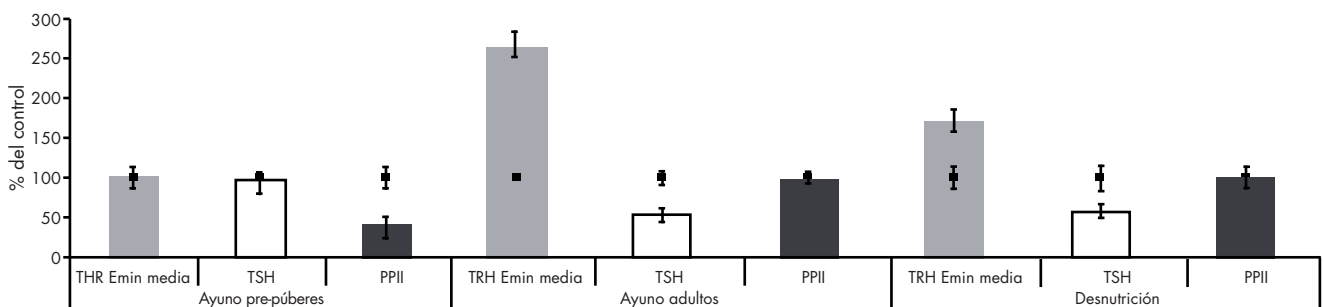


Figura 1. Cambios en los parámetros del eje HHT en animales prepúberes o adultos con ayuno por 48 h; y en desnutridos por 7 semanas. Los valores son el promedio $\pm$ ESM y se expresan como el porcentaje de diferencia con respecto al control (100%) de contenido de TRH evaluado por RIA, el valor control para el grupo ayuno de animales recién destetados = X pg/EM; para TSH= X ng/dl; para PPII X pmol/min/mg de proteína; para el de ayuno de adultos los valores control fueron X pg/EM; para TSH= X ng/dl; para PPII X pmol/min/mg de proteína; para los desnutridos por 7 semanas: X pg/EM; para TSH= X ng/dl; para PPII X pmol/min/mg de proteína. Modificado de de Gortari P. et al., 2000.

La relevancia de estos resultados radica en que la edad es un factor determinante para la adaptación que tiene el eje tiroideo ante un déficit de energía. La desaceleración del eje HHT en ayuno favorece su ahorro de reservas energéticas, mientras que los animales jóvenes se encuentran en mayor riesgo frente al ayuno, ya que pierden un poco menos de tres veces del que pierden los adultos. Esto debido a que su eje HHT no tiene la capacidad adaptativa del adulto.

La disminución de la actividad de la PPII en los animales jóvenes confirmó que la TRH se encuentra liberándose (esto se ha documentado en células adenohipofisarias en cultivo).³⁹ Y de manera relevante apoya que la PPII puede regularse y participar en las adaptaciones del eje tiroideo de animales con un balance negativo de energía.

Además de su papel neuroendocrino, estudios farmacológicos han sugerido que la TRH tiene diversas funciones neuromoduladoras. Su síntesis es abundante en el cerebro, y se han descrito sitios de síntesis y de unión de los dos receptores caracterizados (R1 y R2) y también de la actividad de la enzima PPII en sitios cercanos a los de liberación de TRH.^{40,41} Así, un segundo objetivo del estudio fue el de definir un posible papel de las neuronas de TRH del sistema límbico en los cambios conductuales que sufren los animales en ayuno o restricción alimentaria. Evaluamos el contenido de TRH y del RNAm del pro-TRH por RT-PCR en regiones como la amígdala, el hipocampo, el núcleo *accumbens* y la corteza frontal. Encontramos que el contenido de TRH de la amígdala estuvo reducido en animales adultos con ayuno y los prepúberes presentaron un aumento en el hipocampo, mientras que mostraron disminución en el núcleo *accumbens*. En los animales desnutridos no se observaron alteraciones en comparación a los controles (figura 2).

Las alteraciones de la vía de TRH en la amígdala en animales con ayuno pudieron estar relacionadas con el papel que se le ha atribuido al péptido en procesos de depresión⁴²

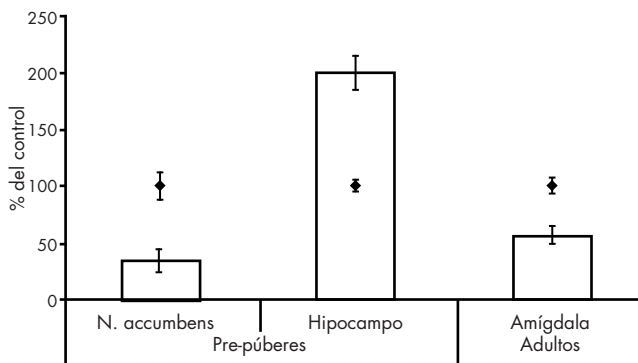


Figura 2. Contenido de TRH en amígdala de animales adultos y en núcleo *accumbens* e hipocampo de prepúberes en ayuno de 48 h. Los valores son el promedio $\pm$ ESM y se expresan como el porcentaje de diferencia con respecto al control (100%) de contenido de TRH evaluado por RIA. El valor control para el n. *accumbens* en los animales control es de = X pg/tejido; para la hipocampo = X pg/tejido, amígdala = X pg/tejido.

y a la alteración del estado de ánimo que presentan los individuos en estas condiciones, ya que esta región se ha implicado en la asociación del valor emocional al consumo de alimentos. Sin embargo, esto no se ha corroborado.

La disminución del contenido de TRH en el núcleo *accumbens* de los animales prepúberes puede interpretarse como mayor liberación y relacionarse con el estado hiperactivo en el que se encontraron estos animales ya que a la TRH de esta región se le ha implicado en la locomoción;⁴³ el aumento en actividad motora pudo contribuir a la mayor pérdida de peso de los animales recién destetados *vs.* los adultos. En el hipocampo, el contenido de RNAm de TRH estuvo disminuido a 58% contra el control (100%),³⁵ lo que sugiere que su síntesis estuviera inhibida; puesto que el contenido, en cambio, aumentó (figura 2), es posible interpretar el cambio como inhibición de la liberación del péptido en esta región. Es posible que las funciones en las que se ha implicado al hipocampo, como la memoria y el aprendizaje, estuvieran alteradas en estos animales, tal como se ha descrito.⁴⁴

LA TRH COMO FACTOR ANOREXIGÉNICO

Las células TRHérgicas del NPV expresan receptores a péptidos hipotalámicos y hormonas periféricas que regulan la conducta alimentaria: del núcleo arqueado (ARC) al neuropéptido Y (NPY, orexigénico), pro-opiomelanocortina (POMC, anorexigénica), leptina; además la reducción de la síntesis de TRH en animales ayunados se reestablece tras una inyección de leptina.⁴⁵ Estos datos apoyan que el péptido participa en las adaptaciones metabólicas debidas a la deficiente disponibilidad de alimento y nos preguntamos si además está involucrado en otros aspectos de la conducta alimentaria, tales como la motivación por el consumo.

Así, utilizando un modelo de anorexia inducido por deshidratación (AN), inicialmente con ratas hembras adolescentes, adultas y luego comparando entre géneros, encontramos que el eje tiroideo no parece tener las adaptaciones que aparecen en un ayuno o en restricción alimentaria.^{46,47}

En este paradigma, los animales consumen durante siete días como agua de bebida una solución de NaCl al 2.5% (AN).⁴⁸ Las hembras adolescentes desde el primer día del experimento reducen su ingesta en 61% y en el quinto hasta 89%; las hembras adultas el primer día ingieren 35% menos y el día siete, 75% menos cuando se comparan contra un grupo control (C) (100%) que consume agua sola y alimento *ad libitum*. A un tercer grupo de animales denominado con restricción alimentaria forzada (RAF) se les ofrece la cantidad de alimento que los deshidratados consumen, de modo que se induce un balance negativo de energía en ambos, difiriendo básicamente en la motivación para ingerir alimento. El peso corporal del grupo AN de hembras adolescentes al final del experimento disminuye 40% y el de las adultas, 26% *vs.* el de los controles C y RAF (100%); los grupos con ano-

Cuadro 1. Cambios en el contenido sérico de hormonas y de TRH en la eminencia media de hembras adolescentes sometidas al modelo de anorexia por deshidratación y evaluadas por RIA. Expresión de TRH en el NPV de hembras adultas por RT-PCR. Los valores son el promedio $\pm$ ESM (n=12). La expresión de TRH es la relación entre la D.O. del cDNA de TRH/cDNA de ciclofilina, expresados como porcentaje de diferencia con respecto al control (100%). ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Fisher, ****p<0.0001 vs control, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs C; *p<0.05 vs AN. El contenido de TRH en la EM de animales control es de 534 $\pm$ 62 pg/EM.

	Control	Anorexia	Restricción alimentaria
Corticosterona (ng/ml)	220.00 $\pm$ 2.0	418.00 $\pm$ 5.0	550.00 $\pm$ 10**
Leptina (ng/ml)	7.00 $\pm$ 0.8	no detectable****	3.00 $\pm$ 0.9****+
TSH (ng/ml)	2.60 $\pm$ 0.2	2.34 $\pm$ 0.4	1.10 $\pm$ 0.1****+
TRH eminencia media (pg/tejido)	5.34 $\pm$ 62	560.00 $\pm$ 40	870.00 $\pm$ 75****+
RNAm de TRH en NPV	100.00 $\pm$ 6.0	132.00 $\pm$ 8.0*	59.00 $\pm$ 7.0*+

rexia de adolescentes y adultas presentan los mismos cambios metabólicos descritos para la restricción alimentaria, tales como las concentraciones séricas de leptina e insulina disminuidas y las de corticosterona incrementadas, pero sin acumulación de TRH en la eminencia media (cuadro 1).⁴⁶ Sin embargo, los animales AN no tienen apetito mientras que los RAF tienen hambre y comerían cantidades semejantes al grupo control si se les ofreciera el alimento. Es decir, la motivación por la ingestión de alimentos está inhibida aun en condiciones de balance negativo de energía.

Algunos de los cambios que únicamente aparecen en los animales AN son la expresión aumentada de CRH en el HL (en animales macho)⁴⁹ y la de TRH en el NPV de hembras adultas en 25% *vs.* el grupo control (100%).⁴⁶ El aumento de síntesis de TRH en las hembras adultas se acompaña de liberación incrementada del péptido (20% menor al control) y de mayor contenido sérico de TSH (58% más que el control tanto en adultas como en adolescentes). El contenido sérico de las HT en hembras adultas, en cambio, disminuye 40%.⁴⁶ Estos datos apoyan una falta de adaptación del eje tiroideo a las condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, ya que aparece un hipotiroidismo primario en lugar de un terciario como en el ayuno y desnutrición; esto puede contribuir a la rápida pérdida de peso característica de la *anorexia nervosa*.

Evaluamos cambios en el metabolismo de la TRH en regiones del sistema límbico tales como la amígdala, el hipocampo, la corteza frontal y la corteza insular. Los antecedentes farmacológicos de las acciones neuromoduladoras de TRH en estas regiones lo postulan como un factor ansiolítico⁵⁰ y con participación en los procesos de memoria y aprendizaje.⁵¹ Las neuronas de la corteza insular (CI) responden a la intensidad de estímulos sensoriales. La palatabilidad de los alimentos está relacionada con su densidad energética y estimula, probablemente a través de la activación de la CI, mecanismos de recompensa positivos que provocan en los animales el volver a buscar y consumir ese tipo de alimentos.

La corteza frontal, a través de sus conexiones con la amígdala, está propuesta como reguladora de la toma de de-

cisiones sobre la selección o preferencia de alimentos;⁵² los sabores agradables o desagradables son capaces de activar esta región en humanos.^{53,54}

En los animales adolescentes hembras encontramos que sólo el hipocampo presentó concentraciones diferentes de TRH entre los grupos AN y RAF (cuadro 2); de hecho es común que exista un deterioro cognitivo y de memoria en animales con balance negativo de energía, aunque esto se ha detectado cuando la desnutrición es crónica.⁵⁵ En cambio, la corteza insular de las hembras adultas AN presentó un contenido diferente de TRH entre los grupos de AN y RAF (cuadro 2) (sin descripción), lo que sugiere que el péptido en esta región pudiera estar involucrado en el reconocimiento del sabor de la sal, así como en los procesos de memoria asociados a éste.^{56,57}

Al mismo tiempo quisimos evaluar si la síntesis de otro potente péptido orexigénico (pre-pro-orexina) expresado en el hipotálamo lateral estaría participando en el despliegue de la conducta de anorexia de los animales deshidratados. Sobre todo porque las neuronas orexinérgicas proyectan sus axones hacia el NPV y hacen contacto sináptico con aquellas que sintetizan NPY y que proviniendo del ARC son aferentes a las TRHérgicas del NPV.⁵⁸

Utilizando animales macho observamos en el hipotálamo lateral de RAF que la síntesis de pre-pro-orexinas estuvo incrementada contra C y AN (cuadro 3). Esto puede indicar

Cuadro 2. Contenido de TRH medido por RIA en regiones del sistema límbico de hembras adolescentes y adultas sometidas a anorexia por deshidratación. Los valores son el promedio $\pm$ ESM (n=12 para los dos grupos de edad). ANOVA de una vía seguida de la prueba post-hoc de Fisher, ****p<0.0001 vs control, *p<0.05 vs C; *p<0.05 vs RAF. El contenido de TRH en el hipocampo en animales control es de 1335 $\pm$ 170 pg/tejido; en corteza insular es de 165 $\pm$ 11 pg/tejido.

	Control	Anorexia	Restricción de alimentos
Hipocampo hembras adolescentes	100 $\pm$ 12	104 $\pm$ 10.0	139 $\pm$ 15**
Corteza insular hembras adultas	100 $\pm$ 4	171 $\pm$ 5**	79 $\pm$ 3

que en los animales con anorexia la vía orexigénica del HL se encuentra alterada y podría ser un factor importante para que no busquen el alimento aun en balance negativo de energía. El cambio diferencial en la expresión del receptor Ox1-R en el NPV confirmó lo anteriormente expuesto: disminuyó en RAF como si estuviera activado por una incrementada liberación de orexinas en este núcleo, mientras que en AN, la expresión de Ox1-R aumentó contra el C (cuadro 3).⁵⁹

En cuanto a los receptores de NPY, sólo Y1 tuvo una disminución en el grupo RAF (con búsqueda activa de alimentos) y no AN; Y5 en cambio no pareció tener alteración alguna entre grupos. Esto nos sugiere que si bien la expresión y posiblemente la liberación de NPY eferente del ARC hacia el NPV se encuentra activada en RAF y en AN, sólo en RAF se presenta una estimulación del receptor Y1. Tal vez esto también contribuyera a que el grupo AN no buscara el alimento⁵⁹ (cuadro 3).

La expresión del receptor de leptina de Ob-Rb estuvo incrementada en RAF sólo con respecto a AN (cuadro 3). Puesto que la vía de leptina se espera inhibida en RAF, este aumento puede representar la inhibición de la vía en estos animales. En ese sentido, AN no presentó dicha inactivación y por lo tanto es posible que la vía de señalización de esta hormona estuviera alterada sólo en ese grupo. Puesto que el RNAm de Ob-Rb colocaliza con el de proTRH en el NPV, es posible que el receptor estuviera permanentemente activo y por lo tanto esto facilitara el aumento en la síntesis de TRH observado en animales con anorexia. Esto está apoyado porque la concentración sérica reducida de leptina en el grupo AN no se correlaciona con la del líquido cefalorraquídeo de estos animales como se ha observado en pacientes con anorexia.⁶⁰

En el estudio pudimos observar una activación diferencial de la vía orexinérgica y de la señalización de leptina y NPY que pudieran participar en el desarrollo de la conducta de anorexia en animales deshidratados; además que esto pudiera efectuarse a través de la regulación de la expresión de TRH en el NPV.

Cuadro 3. Expresión de pre-pro-orexinas en el hipotálamo lateral (HL), del receptor 1 de orexinas (Ox-R1) en el núcleo paraventricular (NPV), del receptor Y1 de NPY y de leptina (Ob-Rb) en el NPV. Los valores son la media $\pm$ ESM (n=8) de la relación entre la D.O. del cDNA de cada gen estudiado/cDNA de un gen control que fue ciclofilina. Los datos están expresados como porcentaje de diferencia con respecto al control (100%). ANOVA de una vía de pre-pro-orexina: $F_{(2,19)} 9.94$, $p < 0.01$, de Ox-R1: $F_{(2,17)} 32.72$, $p < 0.0001$, de Y1: $F_{(2,31)} 39.6$, $p < 0.0001$; de Ob-Rb: $F_{(2,16)} 4.18$, $p < 0.05$ seguida de la prueba post-hoc de Bonferroni, donde ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$, vs. Control; * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ vs AN. Modificado de García-Luna et al., 2010.

	Control	Anorexia	Restricción de alimentos
Pre-pro-orexina en HL	100 $\pm$ 5	79 $\pm$ 15	145 $\pm$ 8**+++
Ox-R1 en NPV	100 $\pm$ 6	68 $\pm$ 15****+	154 $\pm$ 12****
NPY-Y1 en NPV	100 $\pm$ 2	51 $\pm$ 4****+	87 $\pm$ 6
Ob-Rb en NPV	100 $\pm$ 12	122 $\pm$ 14+	79 $\pm$ 4

A la hormona liberadora de corticotropina (CRH) se le ha implicado con un papel anorexigénico. La inyección i.c.v. de CRH en animales con restricción alimentaria provoca que disminuyan su consumo de alimentos.¹³ CRH del NPV dirige el funcionamiento del eje adrenal y se encuentra activado en el balance negativo de energía; el péptido es liberado hacia la sangre porta-hipofisiaria, y a través de sus receptores CRH-R1 es capaz de aumentar la síntesis y liberación de corticotropina (ACTH), la cual tiene como blanco la corteza suprarrenal donde estimula la liberación hacia la circulación de corticosterona.⁶¹ Esta hormona es capaz de inducir la degradación de reservas energéticas, lo que le permite al animal sobrevivir. Sin embargo, en los animales que presentan anorexia inducida por deshidratación, la expresión de CRH se encuentra aumentada pero en el hipotálamo lateral.⁴⁹ El aumento es proporcional a la intensidad de la conducta anoréxica. Esto es importante porque las neuronas de este núcleo tienen conexiones hacia el NPV, y pudieran estar afectando la expresión de TRH.

Como antecedente que apoya esta hipótesis está el aumento del contenido de TRH en neuronas del NPV en cultivo al adicionar CRH. El incremento es máximo una hora después de la adición de CRH y no hay mayor efecto después de 0.1 nM del péptido.⁴⁷

Dos receptores a CRH se han purificado y caracterizado: R1 y R2. Por la abundancia de CRH-R1 en la adenohipófisis se le ha relacionado con la función de CRH en respuesta al estrés; en cambio, se sugiere que CRH-R2 media las acciones anorexigénicas del péptido.^{62,63}

Al analizar los cambios en la expresión de CRH-R2 en el NPV de animales deshidratados y compararlos contra la de animales control y contra aquéllos en restricción alimentaria, observamos que solo en AN existe una disminución del contenido del RNAm del receptor a 65% vs. los controles (100%),⁴⁷ lo que sugiere una posible activación en este grupo de animales debida a la liberación activada de CRH proveniente del hipotálamo lateral.

Con estos resultados propusimos que la inyección directamente en ese núcleo del antagonista específico antisauvagina-30 a animales con anorexia por deshidratación revertiría el aumento ya descrito del RNAm de TRH en el NPV.

Para probarlo realizamos una curva dosis-respuesta, en la que utilizamos 15, 30 y 60nM de antisauvagina-30 para inyectar diariamente por 5 días en el NPV de animales deshidratados, a los que les registramos su peso corporal y su consumo de alimentos. Observamos que sólo la dosis de 30 nM (media) provocó una atenuación de la anorexia en estos animales desde el día cuatro y hasta el siete en el que fueron sacrificados, al comparar con animales AN pero con inyección de solución salina (cuadro 4). En cambio no hubo ninguna alteración en el peso corporal.

Posteriormente, analizamos en animales inyectados con las diferentes dosis, la expresión de TRH en el NPV y encontramos que la dosis media la disminuye a niveles si-

Cuadro 4. Consumo de alimentos en el día 4 y 7 del experimento en el que se sometieron a animales macho adultos con deshidratación e inyección diaria de solución salina o de 30 nM de antagonista de CRH-R2 (antisauvagina-30, ASG-30) en el NPV. Los animales fueron sacrificados el día 7. Se evaluó el contenido de RNAm de TRH en el NPV por RT-PCR y de TSH en suero por RIA. Los datos son el promedio $\pm$ ESM ($n=6$); la expresión de TRH es la relación entre la D.O. del cDNA de TRH/cDNA de ciclofilina y están expresados al igual que los de contenido de TSH como el porcentaje de diferencia vs. el de los controles (100%). El ANOVA de medidas repetidas del consumo de alimentos entre grupos mostró $F_{(3,91)}=3.92$, $p<0.05$. El ANOVA de una vía de la expresión de TRH y TSH en suero fue seguido de una prueba post-hoc de Fisher donde $*p<0.05$, $****p<0.0001$ vs el grupo con inyección salina. Modificado de *de Gortari et al.*, 2009.

	AN + inyección	
	sol. salina	30 nM de ASG-30
Consumo de alimentos (g) día 4	3 $\pm$ 0.5	6 $\pm$ 0.6**
Consumo de alimentos (g) día 7	1 $\pm$ 0.2	6 $\pm$ 0.15**
Expresión de TRH en el NPV	100 $\pm$ 6	54 $\pm$ 8***
TSH en suero	100 $\pm$ 10	70 $\pm$ 11*

milares a los observados en el grupo de restricción alimentaria (cuadro 4).⁴⁷

Además encontramos que el aumento del contenido sérico de TSH en AN y la disminución de la expresión del receptor TRH-R1 en la adenohipófisis fueron revertidos por la inyección del antagonista a CRH-R2. Estos datos apoyan la idea de que los animales con anorexia tienen una activación del eje tiroideo que puede deberse a la estimulación de una vía de CRH. De manera importante, la reversión del cambio en el receptor TRH-R1 en la adenohipófisis sugiere que es la liberación constante de TRH en pacientes con anorexia lo que regula a la baja a estos receptores y, a la larga, desensibiliza a la hipófisis para responder a la TRH. Este característico bloqueo de la respuesta de TSH a TRH en los pacientes anoréxicos se denomina como "eutiroidismo enfermo".

Además, los resultados apoyan que el efecto del bloqueo de CRH-R2 se realiza también sobre el metabolismo de un TRH del NPV que no tiene acciones hipofisiotrópicas y que podría participar en el despliegue de conductas como la anorexia.

Es evidente que a pesar del estricto control que tiene la conducta alimentaria, de la variedad de señales que tienen redundantes efectos para estimular el consumo de alimentos en condiciones de baja disponibilidad, aun así, diferentes situaciones ambientales, estresantes y amenazantes para la integridad física y emocional de los individuos ponen en riesgo la homeostasis energética al inducir en animales y humanos una conducta aberrante como la anorexia. Dada la cantidad de péptidos, neurotransmisores y conexiones cerebrales involucradas en el control de la ingestión de alimentos, el reto de identificarlas y entender el funcionamiento de la red neuronal que integran, no es sencillo. Sin embargo, la incidencia creciente de trastornos afectivos relacionados con la conducta alimentaria, fundamentan los esfuerzos en-

caminados a profundizar en padecimientos como el de la *anorexia nervosa*.

AGRADECIMIENTOS

Los experimentos se realizaron en colaboración con el laboratorio de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular de la doctora Patricia Joseph Bravo del Instituto de Biotecnología, UNAM. En particular al QFB Miguel Cisneros de la misma institución por su asistencia técnica.

REFERENCIAS

- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ et al. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-671.
- Ikemoto S. Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 2007;56:27-78.
- Ikemoto S, Wise R. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology* 2004;47:190-201.
- Rolls E. Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1123-1136.
- Shils M, Olson J, Shike M, Ross A. Nutrición en salud y enfermedad. 9 ed. Nueva York: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
- Gibson E. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiol Behav* 2006;89:53-61.
- Torres S, Nowson C. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 2007;23:887-894.
- Serlachi A, Hamer M, Wardle J. Stress and weight change in university students in the United Kingdom. *Physiol Behav* 2007;92:548-553.
- Gottfried JA, O'Doherty J, Dolan RJ. Encoding predictive reward value in human amygdala and orbitofrontal cortex. *Science* 2003;301:1104-1107.
- Smith PM, Ferguson AV. Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev Disabil Res Rev* 2008;14:96-104.
- Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 1983;218:121-144.
- Potter E, Sutton S, Donaldson C, Chen R et al. Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Neurobiology* 1994;91:8777-8781.
- Arase K, York D, Shimizu H, Shargill N et al. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 1988;255:E255-E259.
- Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY et al. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun* 1969;37:705-710.
- Burgus R, Dunn T, Desiderio D, Guillemin R. Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the PCA-His-Pro-NH₂ sequence. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1969;269:226-228.
- Lechan RM, Segerson TP. Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain. Observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 1989;553:29-59.
- Lechan R.M. Update on thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid Today* 1993;16:1-11.
- O'Leary R, O'Connor B. Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 1995;65:953-963.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80:1523-1631.
- Lanni A, Moreno M, Lombardi A, Goglia F. Thyroid hormone and uncoupling proteins. *FEBS Lett* 2003;543:5-10.

21. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001;81:1097-1142.
22. Nikrodhanond AA, Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Hashimoto K et al. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem* 2006;281:5000-5007.
23. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol* 2007;28:97-114.
24. Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C et al. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988;48:211-213.
25. Bauer K. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 1987;330:375-377.
26. Baskin DG, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci* 1988;11:107-111.
27. Baskin D, Breininger J, Schwartz M. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 1999;48:828-833.
28. Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J et al. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci* 2000;20:9224-9234.
29. Christoffolete MA, Ribeiro R, Singru P, Fekete C et al. Atypical expression of type 2 iodothyronine deiodinase in thyrotrophs explains the thyroxine-mediated pituitary thyrotropin feedback mechanism. *Endocrinology* 2006;147:1735-1743.
30. Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138:4489-4492.
31. Joseph-Bravo P. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone neurons as transducers of energy homeostasis. *Endocrinology* 2004;145:4813-4815.
32. Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW et al. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 2002;143:4513-4519.
33. Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW et al. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology* 2002;143:3846-3853.
34. Raptis S, Fekete C, Sarkar S, Rand WM et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript co-contained in thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates TRH-induced prolactin secretion. *Endocrinology* 2004;145:1695-1699.
35. de Gortari P, González-Alzati M, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Effect of Fasting on the Content of Thyrotropin-releasing Hormone and its mRNA in the Central Nervous System and Pyroglutamate Peptidase II Activity in the Anterior Pituitary of Post-Weaned and Adult Rats. *Nutritional Neuroscience* 2000;3:255-265.
36. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 1991;129:2714-2718.
37. van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H et al. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol* 1995;145:143-153.
38. van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W et al. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol* 1996;150:169-178.
39. Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamate peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology* 1994;60:323-330.
40. Sun Y, Lu X, Gershengorn M. Thyrotropin-releasing hormone receptors - similarities and differences. *J Molec Endocrinol* 2003;30:97-
41. Vargas M, Cisneros M, Herrera J, Joseph-Bravo P et al. Regional distribution of pyroglutamate peptidase II in rabbit brain, spinal cord, and organs. *Peptides* 1992;13:255-260.
42. Sattin A, Pekary A, Lloyd R. TRH in therapeutic vs. nontherapeutic seizures: affective and motor functions. *Pharmacol Biochem Behav* 1999;62:575-583.
43. Yamamura M, Kinoshita K, Nakagawa H, Ishida R. Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog (II): Involvement of the DA system in the locomotor stimulating action of TA-0910. *Jpn J Pharmacol* 1991;55:57-68.
44. Ballard T, Hunter A, Bennett G. Effect of a thyrotropin-releasing hormone analogue, RX77368, on AMPA-induced septal-hippocampal lesioned rats in an operant delayed non-matching to position test. *Psychopharmacology* 1996;127:265-275.
45. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS et al. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997;138:2569-2576.
46. Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav* 2008;53:366-377.
47. de Gortari P, Mancera K, Cote-Velez A, Amaya MI et al. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34:259-272.
48. Watts AG. Dehydration-associated anorexia: development and rapid reversal. *Physiol Behav* 1999;65:871-878.
49. Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly AB. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. *J Neurosci* 1999;19:6111-6121.
50. Gutierrez-Mariscal M, de Gortari P, Lopez-Rubalcava C, Martinez A et al. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:198-213.
51. Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, Balderas I et al. Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 2005;82:306-319.
52. Rolls E. The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex* 2000;10:284-294.
53. O'Doherty J, Rolls E, Francis S, Bowtell R et al. Representation of pleasant and aversive taste in the human brain. *J Neurophysiol* 2001;85:1315-1321.
54. Rolls E, Verhagen J, Kadohisa M. Representations of the texture of food in the primate orbitofrontal cortex: neurons responding to viscosity, grittiness, and capsaicin. *J Neurophysiol* 2003;90:3711-3724.
55. Strupp B, Levitsky D. Early brain insult and cognition: a comparison of malnutrition and hypothyroidism. *Dev Psychobiol* 1983;16:535-549.
56. Rosenblum K, Berman D, Hazvi S, Lamprecht R et al. NMDA receptor and the tyrosine phosphorylation of its 2B subunit in taste learning in the rat insular cortex. *J Neurosci* 1997;17:5129-5135.
57. Hanamori T, Kunitake T, Kato K, Kannan H. Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J Neurophysiol* 1998;79:2535-2545.
58. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L et al. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998;18:9996-10015.
59. Garcia-Luna C, Amaya MI, Alvarez-Salas E, de Gortari P. Prepro-orexin and feeding-related peptide receptor expression in dehydration-induced anorexia. *Regul Pept* 2010;159:54-60.

60. Eckert E, Pomeroy C, Raymond N, Kohler P et al. Leptin in anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:791-795.
61. Aguilera G, Millan M, Hauger R, Catt K. Corticotropin-releasing factor receptors; distribution and regulation in brain, pituitary, and peripheral tissues. *Ann N Y Acad Sci* 1987;512:48-66.
62. Bale T, Contarino A, Smith G, Chan R et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000;24:410-414.
63. Chalmers D, Lovenberg T, DeSouza E. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 1995;15:6340-6350.

Artículo sin conflicto de intereses