

Universidad Miguel Hernández

Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias
Médicas y Quirúrgicas



**PAPEL DE LAS HORMONAS TIROIDEAS DURANTE LA
LACTANCIA EN EL DESARROLLO DE LA COMISURA
ANTERIOR DE LA RATA. CORRELACIÓN ENTRE
IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA Y
MADURACIÓN AXONAL, POSIBLE APLICACIÓN CLÍNICA**

Memoria que presenta el Licenciado en Biología Federico Salas Lucia para
optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández

Director de tesis: Pere Berbel Navarro

Sant Joan d'Alacant, 2018

Esta tesis doctoral hace referencia al artículo:

Lucia FS, Pacheco-Torres J, González-Granero S, Canals S, Obregón M-J, García-Verdugo JM and Berbel P. Transient Hypothyroidism During Lactation Arrests Myelination in the Anterior Commissure of Rats. A Magnetic Resonance Image and Electron Microscope Study. *Front. Neuroanat* (2018) 12:31. doi: 10.3389/fnana.2018.00031S.





Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y quirúrgicas

D. Félix Gutiérrez Rodero, Coordinador del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

AUTORIZA:

La presentación y defensa como tesis doctoral del trabajo **“Papel de las hormonas tiroideas durante la lactancia en el desarrollo de la comisura anterior. Correlación entre imagen de resonancia magnética y maduración axonal, posible aplicación clínica”** realizada por D. Federico Salas Lucía bajo la dirección el Dr. D. Pere Berbel Navarro. De acuerdo a la información recibida sobre las evaluaciones previas realizadas en cumplimiento de la normativa general vigente y la propia Universidad Miguel Hernández y según lo certificado por las personas que han realizado la tutoría y dirección, la tesis cumple los requisitos para proceder a su defensa pública.

En Sant Joan d'Alacant, a veintiocho de febrero de dos mil dieciocho

Fdo. Prof. Félix Gutiérrez Rodero





Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y quirúrgicas

D. Pere Berbel Navarro, director de la tesis doctoral **“Papel de las hormonas tiroideas durante la lactancia en el desarrollo de la comisura anterior. Correlación entre imagen de resonancia magnética y maduración axonal, posible aplicación clínica”**

CERTIFICA:

Que D. Federico Salas Lucía ha realizado bajo mi supervisión su memoria de tesis doctoral titulada **“Papel de las hormonas tiroideas durante la lactancia en el desarrollo de la comisura anterior. Correlación entre imagen de resonancia magnética y maduración axonal, posible aplicación clínica”** cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmo en Sant Joan d'Alacant, a veintiocho de febrero de dos mil dieciocho

Fdo. Prof. Pere Berbel Navarro



FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido financiada por la fundación Alicia Koplowitz para el proyecto de investigación “Papel de las hormonas tiroideas maternas durante la lactancia en la maduración de las comisuras telencefálicas del lactante. Correlación entre imagen de resonancia magnética y maduración axonal, posible aplicación clínica.” y por la del Ministerio de Economía y Consumo SAF2014-58256-R para el proyecto de investigación “Desarrollo del sistema glinfático en la corteza cerebral de la rata. Papel de las hormonas tiroideas” del Ministerio de Ciencia e Innovación, ambos concedidos al Prof. Pere Berbel.

A Mamina





AGRADECIMIENTOS

Mi director de tesis, mentor y colega, el Prof. Pere Berbel, ha tratado de enseñarme lo que debe saber el aficionado a la investigación. Me siento afortunado de haber sido copartícipe de sus métodos de estudio, basados en la observación minuciosa de los datos, interpretación de los resultados, y la siembra y reposo de las palabras. Con su ejemplo diario ha promovido en mí la vocación y el compromiso con la investigación científica. Por todo ello, le estoy tremendamente agradecido.

Estoy especialmente en deuda con el Dr. Jesús Pacheco Torres por su amistad, consejos y ayuda en mi investigación. También, le doy las gracias a María M. Camuñas por su amistad y gran apoyo técnico. Ambos han sido un gran apoyo diario.

Gracias a mi familia y amigos, por el apoyo incondicional y los consejos imparciales.





RESUMEN

La deficiencia de hormonas tiroideas durante las edades posnatales tempranas afecta la citoarquitectura y función de las áreas telencefálicas, incluyendo la neocorteza, causando un amplio espectro de enfermedades neurológicas y mentales. Las áreas neocorticales envían la mayoría de sus axones interhemisféricos a través del cuerpo calloso y en menor medida a través de la comisura anterior (CA), mientras que las áreas límbicas proyectan principalmente por la CA y las comisuras hipocámpicas.

Datos de resonancia magnética funcional de niños con hipotiroidismo congénito con memoria de procesamiento verbal anormal sugieren que las conexiones telencefálicas ipsi- y contra- laterales están alteradas. El hipotiroidismo gestacional afecta el desarrollo de la CA, pero el posible efecto del hipotiroidismo posnatal transitorio o crónico, como ocurre en los neonatos con hipotiroidismo congénito diagnosticados tardíamente y en niños que crecen en zonas deficientes en yodo continúa siendo desconocido.

Nosotros hemos estudiado el desarrollo de la CA, usando imágenes de resonancia magnética *in vivo* (IRM) y microscopia electrónica (ME), en ratas macho controles e hipotiroideas. Se han estudiado cuatro grupos de ratas tratadas con metimazol (MMI). Un grupo fue tratado desde el día posnatal (P) 0 hasta P21; algunas de estas ratas fueron tratadas adicionalmente con L-tiroxina (T4) de P15-21, como modelo de hipotiroidismo temprano transitorio. Otras ratas fueron tratadas con MMI de P0-150 y el grupo restante desde el día embrionario 10 hasta P170, ambos como modelo de hipotiroidismo crónico. Los resultados se compararon con ratas controles de la misma edad. El cociente T_{2r} , obtenido con IRM, fue mayor en ratas MMI y correlacionó con el descenso del número y porcentaje de axones mielínicos, obtenidos con ME. En las ratas MMI a P150, el cociente g y la velocidad de conducción de los axones mielínicos fue similar al de las ratas control, pero el retraso de conducción de la señal entre zonas homotópicas contralaterales fue menor.

Estos datos muestran que el hipotiroidismo posnatal transitorio y crónico altera la maduración de la CA, lo cual no puede ser revertido con un tratamiento tardío con T4. Estas alteraciones afectan las conexiones contralaterales a través de la CA, incluyendo las de la corteza piriforme y áreas amigdaloides. Nuestros datos apoyan el retraso neurocognitivo encontrado en los niños con hipotiroidismo congénito tratados tardíamente con T4, y podría ayudar a entender la fisiopatología de enfermedades psiquiátricas asociadas al sistema límbico tales como el desorden bipolar.



SUMMARY

Thyroid hormone deficiency at early postnatal ages affects the cytoarchitecture and function of telencephalic areas, including the neocortex, resulting in a wide spectrum of neurological and mental diseases. Neocortical areas send interhemispheric axons mostly through the corpus callosum and to a lesser extent through the anterior commissure (AC), while limbic areas mostly project through the AC and hippocampal commissures.

Functional magnetic resonance data of children late diagnosed for congenital hypothyroidism with abnormal verbal memory processing suggest altered ipsi- and contra- lateral telencephalic connections. Gestational hypothyroidism affects AC development but the possible effect of transient and chronic postnatal hypothyroidism as occurs in late diagnosed neonates with congenital hypothyroidism and in children growing up in iodine deficient areas still remains unknown.

We have studied the AC development, using *in vivo* magnetic resonance imaging (MRI) and electron microscopy (EM) in hypothyroid and control male rats. Four groups of methimazole (MMI) treated rats were studied. One group was MMI-treated from postnatal day (P) 0 to P21; some of these rats were additionally treated with L-thyroxine (T4) from P15-21, as a model for early transient hypothyroidism. Other rats were MMI-treated from P0-150 and the remaining from embryonic day 10 to P170, as a chronic hypothyroidism group. The results were compared with age paired control rats. The T₂ ratio obtained with MRI was higher in MMI-treated rats and correlated with the decreased number and percentage of myelinated axons obtained with EM. In MMI-treated rats, the myelinated axon g-ratio and conduction velocity was similar to C rats, but conduction delays between homotopic contralateral areas decreased.

These data show that early postnatal transient and chronic hypothyroidism alters AC maturation, which cannot be reverted after delayed T4-treatment. These alterations affect contralateral connections through the AC, including those between the piriform cortex and amygdaloid areas. Our data support the neurocognitive delay found in late T4-treated children with congenital hypothyroidism, and may help to understand the pathophysiology of psychiatric diseases associated to the limbic system such as the bipolar disorder.



ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Las hormonas tiroideas	7
1.1.1 Biosíntesis de hormonas tiroideas	7
1.1.2 Transporte de las hormonas tiroideas al interior de las células	10
1.1.3 Metabolismo de las hormonas tiroideas	10
1.1.4 Acción intracelular de las hormonas tiroideas	11
1.1.5 Regulación de la síntesis de las hormonas tiroideas	12
1.1.6 La función tiroidea materna y del neonato durante la lactancia.....	13
1.1.7 Hipotiroidismo congénito.....	14
1.1.8 Hipotiroidismo posnatal y desarrollo neurológico	15
1.2 Comisuras interhemisféricas.....	16
1.2.1 Neocorticogénesis en la rata.....	16
1.2.2 Desarrollo de las comisuras interhemisféricas	16
1.2.3 Comisura anterior.....	18
1.2.4 Importancia de las hormonas tiroideas en el desarrollo de las comisuras interhemisféricas	19
1.2.5 Enfermedades neurológicas y psiquiátricas en humanos, asociadas a alteraciones de las comisuras telencefálicas	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2.1 Hipótesis generales	25
2.2 Objetivos específicos	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Animales de experimentación.....	29
3.2 Control del hipotiroidismo.....	30
3.3 Microscopía electrónica.....	31

3.4 Estudio morfométrico de los axones de la comisura anterior	31
3.5 Adquisición y procesamiento de las imágenes de resonancia magnética.....	32
3.6 Análisis estadístico	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Peso corporal y niveles de hormonas tiroideas	37
4.2 Estudio de la CA con IRM.....	38
4.3 Correlación entre valores de T _{2r} y datos cuantitativos de ME	40
4.4 Estudio con ME de la CA a P150	44
4.5 Datos funcionales de la conectividad de la CA a P150	52
5. DISCUSIÓN	57
5.1 Consideraciones metodológicas; limitaciones y puntos fuertes	59
5.2 Transferencia de la información alterada en las ratas MMI	60
5.3 Comportamiento alterado en las ratas MMI	62
5.4 Implicaciones en enfermedades neurológicas y psiquiátricas de humanos	63
6. CONCLUSIONES	65
7. DESARROLLO FUTURO DE LA TESIS	69
8. BIBLIOGRAFÍA	73
9. APENDICE: PUBLICACIONES	89



ABREVIATURAS

Abreviaturas

BHE: Barrera hematoencefálica
C: ratas controles
CA: Comisura anterior
CC: Cuerpo calloso
D1, D2 y D3: Yodotironinas desyodadas tipo 1, 2 y 3:
DIT: Diyodotirosina
E: Día embrionario
HC: Hipotiroidismo congénito
HPT: Eje hipotálamo, pituitaria, tiroides
HT: Hormonas tiroideas
IRM: Imagen de resonancia magnética
KClO₄: Perclorato potásico
LAT: Transportador de amino ácidos neutros de gran tamaño
MCT: Transportadores monocarboxilato
ME: Microscopía electrónica
MIT: Monoyodo tirosina
MMI: Metimazol
MO: Microscopía óptica
NIS: Simportador de sodio/yoduro
OATP: Transportador de polipéptidos aniónicos orgánicos
P: Día posnatal
R-ant: Rama anterior de la comisura anterior
RDI: Región de interés
R-post: Rama posterior de la comisura anterior
rT3: 3, 3', 5'-Triyodotironina o T3 reversa
SLC10A1: Polipéptido co-transportador de sodio/taurocolato
SNC: Sistema nervioso central
T_{2p}: Imagen de resonancia magnética ponderada en T2.
T_{2r}: Cociente de T2
T3: 3,3',5-Triyodotironina
T4: 3',5',3,5-Tetrayodo-L-tironina
TPO: Tiroperoxidasa
TR: Receptores nucleares de hormonas tiroideas
TRH: Hormona liberadora de tirotrópina
TSH: hormona estimuladora del tiroides o tirotrópina





1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las hormonas tiroideas

1.1.1 Biosíntesis de hormonas tiroideas

Las hormonas tiroideas (HT) son esenciales para el correcto desarrollo y crecimiento de los vertebrados. Tienen efectos sobre casi todos los tejidos del organismo y entre sus funciones principales actúan en el desarrollo y función del sistema nervioso central (SNC) y periférico, regulan el metabolismo basal, tienen acción termorreguladora, influyen en la síntesis y degradación de carbohidratos, grasas y proteínas y aumentan el consumo de oxígeno. Un desequilibrio en el balance de las HT en adultos suele ser reversible con un tratamiento adecuado. Por el contrario, la deficiencia de HT durante el desarrollo causa daños irreversibles, tanto más graves como temprana, prolongada y severa sea dicha deficiencia (Berbel et al., 2007).

Las HT se sintetizan en la glándula tiroides que está compuesta de folículos, considerados desde el punto de vista estructural y funcional como las unidades secretoras. Las células de los folículos (tirocitos) constituyen un epitelio monoestratificado y son las que sintetizan las HT, mientras que el lumen es el almacén de reserva, cuyo interior contiene una mezcla de proteínas, siendo la más importante la tiroglobulina. La organización folicular y la polaridad de los tirocitos son esenciales para la biosíntesis de las HT (Dumont et al., 2011).

Las HT, la tiroxina (3',5',3,5-tetrayodo-L-tironina; T4) y la 3',3,5-triyodotironina (T3), son tironinas yodadas, siendo el yodo un elemento indispensable para su síntesis. El yodo reducido en forma de yoduro entra en los tirocitos por el simportador de sodio/yoduro (NIS; De la Vieja et al., 2000) y a la luz folicular por el canal iónico pendrina (Fig.1; Bizhanova y Kopp, 2009). Tanto la oxidación del yoduro como su unión a los residuos de tirosina de la tiroglobulina para producir monoyodo tirosina (MIT) y diyodo tirosina (DIT), y su posterior acoplamiento para generar residuos de T3 y T4 son catalizados por la tiroperoxidasa (TPO) localizada en la membrana apical de los tirocitos en presencia de peróxido de hidrógeno (Song et al., 2007). Sin embargo, sólo una pequeña proporción de los residuos de MIT y DIT se acoplan para formar T3 (DIT con MIT) o T4 (DIT con DIT). En respuesta a una disminución de la concentración de T3 y T4 en sangre, las tiroglobulinas pasan al interior del tirocito por pinocitosis y son hidrolizadas por cathepsinas en los lisosomas (Rousset et al., 2015), liberando moléculas de MIT, DIT, T3 y T4 (Tokuyama et al., 1987). La tirotropina (TSH) regula positivamente este proceso uniéndose a receptores específicos acoplados a proteínas G de la membrana basal de los tirocitos, aumentando la concentración del calcio intracelular y la de adenosin monofosfato cíclico, lo cual incrementa la actividad pinocitótica (Rousset et al., 2015). Existe también un mecanismo de regulación negativa, llevado a cabo por las tiroglobulinas acumuladas en los folículos que inhibe la expresión génica en tirocitos (Suzuki et al., 1999). Datos recientes muestran que la tiroglobulina folicular induce la expresión del transportador de

monocarboxilato (MCT) 8 (Ishido et al., 2015) por el que las HT pasan al torrente sanguíneo (Friesema et al., 2003).

El yoduro inorgánico aportado por la dieta es necesario para la síntesis de HT. Aunque, el reciclaje de yoduro en el interior de los tirocitos a partir de los residuos de MIT y DIT es también crucial. Este reciclaje es mediado por la dehalogenasa Dehal1 de la membrana apical de los tirocitos (Gnidehou et al., 2004) y está codificada en humanos por el gen *DEHAL1* (Moreno et al., 2001). La Dehal1 desyoda MIT y DIT, recuperando yodo para nueva síntesis de HT. Este proceso de reciclaje de yodo es muy importante ya que se han encontrado mutaciones *DEHAL1*^{-/-} en pacientes con hipotiroidismo central grave (Moreno et al., 2008).

En condiciones de yodo suficiencia es mayor el número de residuos DIT frente al de MIT (Dunn y Dunn, 2000). Mientras que en condiciones de yodo-insuficiencia grave o moderada (yodo en orina en niños en edad escolar entre 20-49 mg/l y 50-100 mg/l, respectivamente), la glándula tiroides responde rápidamente a través de mecanismos de autorregulación (independiente de TSH) favoreciendo la síntesis de T3 y por tanto el cociente T4/T3 disminuye. Como consecuencia, los niveles circulantes de T3 se mantienen normales, o incluso pueden aumentar ligeramente, y la TSH circulante no aumenta, como ocurre en la hipotiroxinemia (Morreale de Escobar et al., 2000, 2004).

En el torrente sanguíneo, las HT pueden circular libres (aproximadamente el 0,03% de la T4 y el 0,3% de la T3 totales; Pappa et al., 2015) o unidas a una serie de proteínas transportadoras (Refetoff et al., 1970) tales como la tiroglobulina fijadora de hormonas tiroideas, la albúmina sérica y la transtiretina, uniendo el 75%, 19% y 2% de la T4 circulante total, respectivamente (Oppenheimer, 1968). En ausencia de proteínas transportadoras, cualquier alteración aguda en la síntesis de HT resultaría en una rápida depleción de la T4 extratiroidea. Estas proteínas sirven como mecanismo de protección contra la pérdida de yodo en orina y ayudan a distribuir uniformemente las HT a los tejidos, (Mendel et al., 1987).

1.1.2 Transporte de hormonas tiroideas al interior de la célula

El influjo y eflujo celular de HT esta facilitado por proteínas transportadoras transmembrana que se expresan en un amplio número de tejidos (Friesema et al., 2005; Kinne et al., 2011). Para que las HT alcancen las células diana en el cerebro es necesario que atraviesen las barreras que restringen el paso de sustancias desde la circulación. Las principales barreras son el plexo coroideo y la barrera hematoencefálica que están formadas por tunicitos y células endoteliales, respectivamente. Existen 4 familias de transportadores con capacidad para transportar yodotironinas a través de las membranas celulares, tales como los transportadores MCT, los de polipéptidos aniónicos orgánicos (OATP), los de amino ácidos neutros de gran

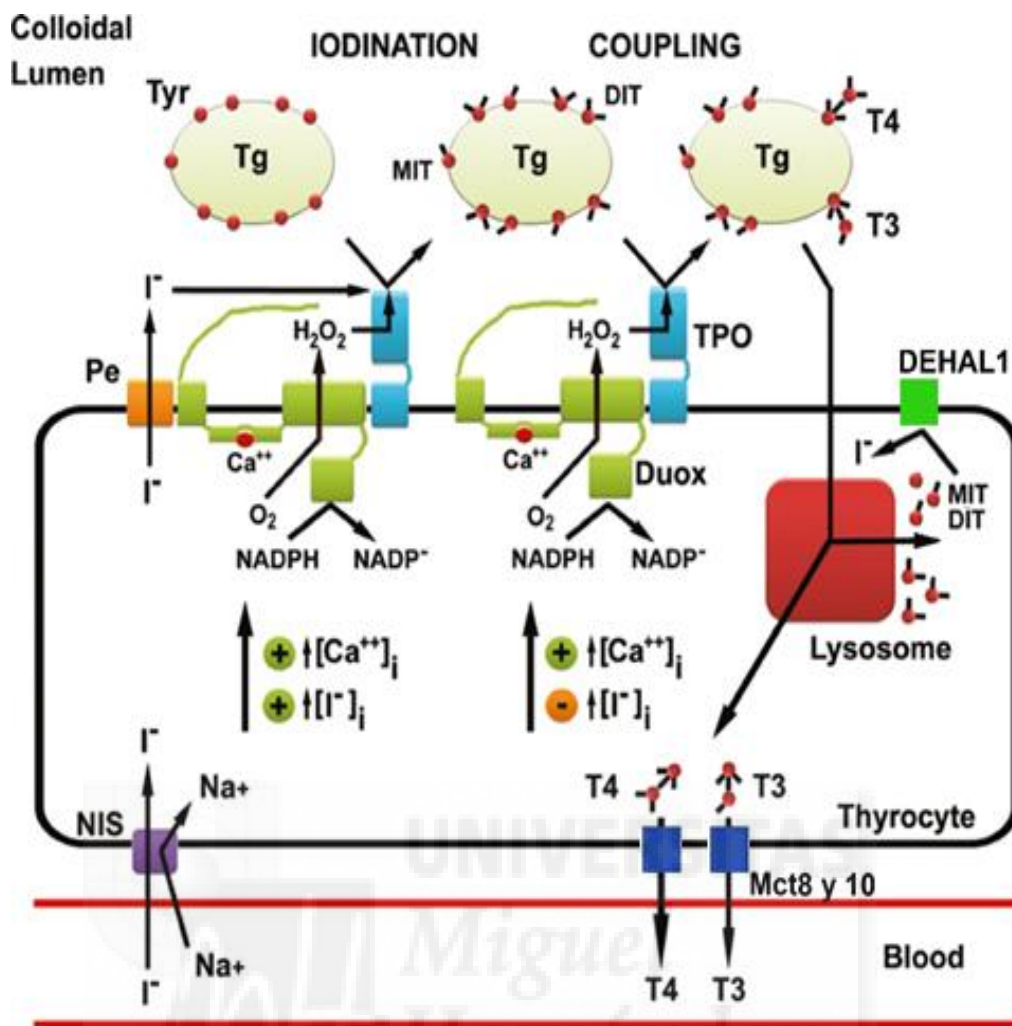


Figura 1. Biosíntesis de las hormonas tiroideas. Se muestran las principales vías metabólicas en los tirocitos involucradas en la yodación de la tirosina y en el acoplamiento de MIT y DIT para formar las HT. El co-transportador de sodio/yoduro (NIS) transporta el yoduro a los tirocitos, luego pasa al lumen coloidal a través de un canal de aniones (pendrina; PE). La tiroperoxidasa (TPO) oxida el yoduro en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que luego se transfiere a los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Tg) para formar el MIT y DIT (reacción de yodación). Una vez más, la TPO en presencia de H_2O_2 cataliza el acoplamiento de DIT y MIT, y de DIT y DIT para formar los residuos de T3 y T4, junto a la Tg (reacción de acoplamiento). En el lisosoma, se liberan los residuos de MIT, DIT, T3 y T4. Parte de los residuos de MIT y DIT son metabolizados por la enzima DEHAL1 mientras que T3 y T4 pasan a la sangre, principalmente a través de los transportadores MCT 8 y 10. El H_2O_2 se produce en la membrana plasmática apical por una NADPH oxidasa dual (DUOX), en presencia de calcio. Una alta concentración intracelular de calcio favorece tanto la yodación como las reacciones de acoplamiento. Una alta concentración intracelular de yoduro favorece la yodación, pero inhibe el acoplamiento (Figura modificada de Berbel y Morreale de Escobar, 2011).

tamaño (LAT) y el polipéptido co-transportador de sodio/taurocolato (SLC10A1, comúnmente llamado NTCP). La importancia de estos transportadores en el control de la acción de las HT está reportada en el síndrome asociado a mutaciones en el MCT8 o síndrome de Allan-Herndon-Dudley (Allan et al., 1944; Dumitrescu et al., 2004; Friesema et al., 2005; Bernal, 2011a).

Hasta la fecha, se han identificado transportadores en las células endoteliales de los capilares cerebrales (OATP1a4, OATP1c1, LAT1, LAT2, MCT8), en los tanicitos del plexo coroideo (OATP1c1, MCT8), en astrocitos (OATP1c1, LAT1, MCT8), microglía (OATP2b1, LAT1, LAT2, MCT8, MCT10), neuronas (LAT1, LAT2, MCT8, MCT10) y células precursoras de oligodendrocitos (LAT1, LAT2, MCT8) (Abe et al., 2002; Friesema et al., 2005; Bernal, 2005; Gao y Meier, 2001; Sugiyama et al., 2003; Ohtsuki et al., 2004; Roberts et al., 2008; Ceballos et al., 2009). Sin embargo, la identificación de mutaciones patogénicas y los resultados de estudios realizados en animales indican que sólo MCT8, MCT10 y OATP1C1 tienen un papel fisiopatológico en el transporte de las HT y pueden inducir enfermedades graves que se manifiestan en el feto y neonato (Bernal, 2011a; Schwartz y Stevenson, 2007).

1.1.3 Metabolismo de las hormonas tiroideas

Las HT se metabolizan mediante la glucoronización, sulfatación y desyodación, siendo esta última la más importante. Se han identificado tres selenoproteínas encargadas de desyodar T4 y T3: las desyodasas de yodotironinas tipo 1 (D1), 2 (D2), y 3 (D3). Las D1 y D2 tienen actividad desyodasa sobre el anillo externo de las tironinas metabolizando T4 a T3 y T3 reversa (T3r) a 3,3'-T2 (T2). Las D1 y D3 tienen actividad desyodasa sobre el anillo interno, metabolizando T4 a T3r y T3 a T2 (Fig.2).

La D1 se expresa principalmente en el hígado, riñón y tiroides, mientras que las D2 y D3 se expresan en el SNC, en tejido adiposo marrón y en músculo. La principal función de la D1 es el metabolismo de T3r a T2 y el de T4 a T3, aumentando la T3 plasmática (Bianco et al., 2002; Bianco y Larsen, 2005; Bianco y Kim, 2006). En el SNC, la D2 se expresa en astrocitos y tanicitos (Guadaño-Ferraz et al., 1997) y su principal función es la de adaptar el estado tiroideo celular a las necesidades fisiológicas, mediante la generación local de T3, pero no contribuye significativamente al aumento de la T3 circulante (Bianco et al., 2002; Bianco y Kim, 2006). La D3 se expresa en tejidos fetales y en el cerebro adulto. La expresión de D3 puede cambiar bajo ciertas condiciones patológicas tales como enfermedades críticas o en algunos cánceres (Huang et al., 2002; Peeters et al., 2005).

El papel determinante de las desyodasas en la regulación local de las HT está bien ilustrado en el desarrollo de la cóclea, donde la D3 se expresa después del inicio de la actividad de la D2 (Ng et al., 2004; 2009). En etapas inmaduras, la D3 disminuye la concentración local de T3, mientras que posnatalmente, la expresión de D2 aumenta lo que resulta en un aumento

local de T3, desencadenando el inicio de la función auditiva. Algo similar ocurre también en el desarrollo del cerebelo (Peeters et al., 2012) y de la retina (Ng et al., 2010).

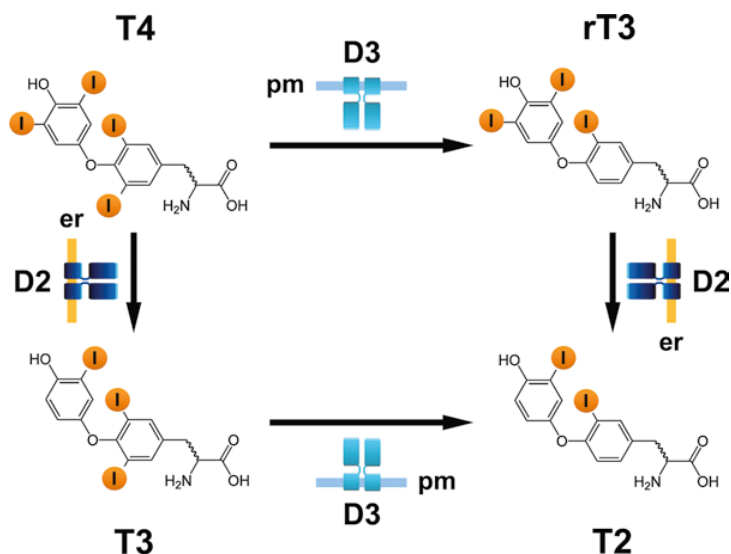


Figura 2. Estructura de las HT y metabolismo mediado por desyodasas en el SNC. La D2 cataliza la conversión tanto de T4 a T3 como de T3r a T2. La D3 transforma la T4 en T3r y la T3 en T2. Estas últimas se encuentran en la membrana plasmática (pm) de las neuronas, mientras que D2 se encuentra en el retículo endoplásmico (er) de astrocitos y tanicitos. (Figura de Berbel y Morreale de Escobar, 2011).

1.1.4 Acción intracelular de las hormonas tiroideas

Las HT activan en células diana vías de señalización genómica si se une a receptores nucleares, y no genómica, si se une a receptores citoplásmicos. En la vía de señalización genómica, la T3 tiene una mayor afinidad por los receptores nucleares de hormona tiroidea (TR) que la T4, actuando esta última como prohormona.

La acción principal y mejor estudiada es la genómica, donde la T3 se une a TR que son factores de transcripción dependientes de ligando, codificados por los genes *TRα* y *TRβ*. Estos genes codifican las isoformas TRα1, TRβ1, TRβ2 y TRβ3 con diferente afinidad a T3 (Forrest y Vennström, 2000; Bernal, 2005). En ausencia de T3, los TRs interactúan con moléculas coreguladoras, como el receptor de retinoide X y con moléculas corepresoras. La unión de T3 al TR, induce la regulación positiva y negativa de genes específicos (Gil-Ibáñez et al., 2017). En el SNC, los TR se expresan predominantemente en las neuronas, pero se han detectado también en oligodendrocitos en cultivo, astrocitos y microglía (Lima et al., 2001), y regulan la expresión de muchos genes implicados en el desarrollo y maduración del cerebro (Bernal, 2002; Morte et al., 2010; Chatonet et al., 2015; Berbel et al., 2014). Se observado recientemente en cultivos primarios de células cerebro-corticales que la T4 también tiene actividad genómica, presentando

una mayor actividad sobre los genes regulados negativamente (1/5 de la actividad de T3) que sobre los regulados positivamente (1/40 de la actividad de T3; Gil-Ibáñez et al., 2017).

Las acciones no genómicas de las HT intervienen en muchos procesos fisiológicos de células diferentes y son ejercidas por unión a receptores de la membrana plasmática y del citoplasma, activando canales iónicos, fosforilación oxidativa y segundos mensajeros (Bassett et al., 2003). Se ha descrito que la T4 tiene alta afinidad por la integrina $\alpha\beta_5$, activando la vía de señalización de MAPK (ERK1/2) y subsecuentemente, la angiogénesis y el crecimiento celular (Cohen et al., 2011). También el receptor citoplasmático de HT, TR β 1 es capaz de activar la fosfatidil inositol 3 quinasa, regulando la expresión postranscripcional del factor 1- α inducible por hipoxia (Taglieri et al., 2017). Además, las HT también regulan la función de las mitocondrias (Vidali et al., 2016) y median respuestas termogénicas rápidas (Lombardi et al., 2015).

No obstante, la señalización de las HT puede ser aún más diversa y compleja. Estudios recientes contemplan factores tales como el control de la disponibilidad de ligando, cambios en la sensibilidad de las células a los efectos de T3 e interacciones con otras vías de señalización (Flamant et al., 2007).

1.1.5 Regulación de la síntesis de hormonas tiroideas

El aporte de HT está regulado por un mecanismo de retroalimentación que incluye el eje hipotálamo, pituitaria y glándula tiroidea (eje HPT). El eje HPT libera la hormona liberadora del tiotropina (TRH), producida por neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo y la TSH, sintetizada en las células tirotropas de la pituitaria que modula la síntesis y secreción de T4 y T3 por la glándula tiroidea (Chiamolera et al., 2009). Las HT son las principales encargadas de la regulación negativa del eje HPT, controlando la secreción de TRH y TSH (García et al., 2004).

La T4 alcanza las neuronas productoras de TRH del hipotálamo cruzando la barrera hematoencefálica y el plexo coroideo, accediendo al líquido cerebroespinal. La T4 pasa los tanicitos del tercer ventrículo mediante transportadores MCT8, donde es metabolizada a T3 por la D2. En las neuronas del hipotálamo, la T3 regula negativamente la transcripción de TRH. Por lo tanto, en las neuronas hipotalámicas, la D2 que regula la concentración intracelular de T3 y la D3 que incrementa T3r, son enzimas reguladoras de la función hipotalámica frente a cambios agudos de T4 circulantes (Galton et al., 2009; Fekete y Lechan, 2007). Por otro lado, la T4 (y en menor medida la T3) alcanza a las células tirotropas de la pituitaria desde la circulación sistémica. La T3, obtenida por acción de la D2 de las células tirotropas, se une al receptor nuclear TR β , impidiendo la transcripción de TSH (Cheng et al., 2010).

También se ha identificado un circuito muy corto de control de la secreción de TSH a nivel local que involucra las células tirotropas y las estrelladas de la pituitaria anterior, las cuales expresan el receptor de TSH. La TSH secretada, se une a ellas activando la vía de

señalización JAK/STAT5a, induciendo la expresión del factor de crecimiento transformante B2. Este factor estimula a receptores en células tirotropas, disminuyendo la secreción de TSH (Brokken et al., 2005). Este efecto autoregulatorio paracrino local de la TSH no sólo interviene en la modulación negativa de la secreción de TSH, sino que también puede estar involucrado en cambios oscilatorios de TSH (Prummel et al., 2004).

Además de este sistema de regulación hormonal, parece existir una vía de regulación a través de circuitos neuronales, independiente de HT, en respuesta a condiciones fisiológicas tales como el ayuno, las bajas temperaturas y los ritmos circadianos (Costa-e-Sousa et al., 2012).

1.1.6 La función tiroidea materna y del neonato durante la lactancia

Aunque los recién nacidos disponen de yodo almacenado en el tiroides durante la vida intrauterina, éstos requieren un aporte de yodo materno adicional durante la lactancia y durante los dos primeros años de vida, por la ingesta de alimentos, para que su glándula tiroides funcione correctamente y garantice el desarrollo del cerebro (Morreale de Escobar et al., 2004; Zoeller y Rovet, 2004; Glinoe 2004, 2007).

En las mujeres lactantes, prácticamente todo el yodo absorbido por la dieta se reparte en el epitelio secretor de la glándula mamaria, el tiroides y el riñón (Brown-Grant, 1957; DeGroot, 1966). El simportador NIS controla la entrada de yoduro a la glándula mamaria y su expresión aumenta durante la lactancia, bajo la influencia de las hormonas prolactina, estradiol y oxitocina (Rilema y Hill, 2003; Azizi y Smyth, 2009). La concentración de yodo en la leche materna humana es entre 20 y 50 veces superior a la presente en el plasma que en condiciones de yodo suficiencia es de 150-180 $\mu\text{g/l}$ (Azizi et al., 2009). Por ello, se ha estimado que la ingesta materna de yodo recomendada durante la lactancia debe ser de 250-300 $\mu\text{g/día}$, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Asociación Americana del Tiroides (ATA) y el Consejo Internacional para el Control de Desórdenes por Deficiencia de Yodo (ICCIDD, Zimmermann y Delange, 2004 Zimmermann, 2007; Andersson et al., 2007; Stagnaro- Green et al., 2011a).

Un elevado número de mujeres embarazadas y lactantes tienen una ingesta de yodo inadecuada, incluso en zonas donde se ha promovido el consumo de sal yodada desde hace años y que han sido clasificados como libres de la deficiencia de yodo como el Reino Unido (Azizi et al., 2003; Lazarus y Smyth, 2008; Zimmermann, 2011). La ingesta de sal yodada que ha demostrado ser suficiente para los niños escolares, no lo es para las mujeres lactantes (Andersson et al., 2007; Hollowell y Haddow, 2007; NHANES III, 1988-1994). En vista de esta situación, la ATA ha publicado unas guías para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades del tiroides durante la gestación y posparto, avaladas por la OMS, donde se recomienda dar un suplemento de 150 μg de yodo (200 μg de KI) a todas las mujeres que

planeen quedar embarazadas, durante el embarazo y la lactancia (Becker et al., 2006, Stagnaro-Green et al., 2011b; Alexander et al., 2017). Un suplemento de 100-200 mg de yodo al día durante un período de aproximadamente 15 meses (embarazo y lactancia) no representa peligro para el feto y el neonato (Andersson et al., 2007; Zimmermann, 2007; Velasco et al., 2009; Alexander et al., 2017).

Así como el yodo en leche materna es crucial para el desarrollo del neonato, el papel de las HT esta poco claro. La cantidad de T3 y T4 en la leche materna de diferentes especies es muy variable (Akasha y Anderson, 1984; Koldovský y Thornburg, 1987) y estudios más recientes muestran que la concentración de tiroxina en la leche materna es demasiado baja para alterar el estado hipotiroideo del lactante (Van Wassenaer et al., 2002; Alexander et al., 2017).

1.1.7 Hipotiroidismo congénito

El hipotiroidismo congénito (HC) es un tipo frecuente de hipotiroidismo neonatal con una incidencia de 1 de cada 3000-3500 recién nacidos. Esta enfermedad está causada comúnmente por problemas en el desarrollo de la glándula tiroides (disgenesia) y por un desorden en la síntesis de HT (dishormonogénesis), resultando en un HC primario.

El HC secundario central (HCC) se caracteriza por un déficit de la síntesis, secreción y bioactividad de TSH, y resulta en una estimulación inapropiada de la glándula tiroides. En la actualidad, se han identificado mutaciones causantes del HCC en los genes *TSHB* (codifica la subunidad Beta de la TSH), el *TRHR* (codifica el receptor TRH) y recientemente, en el factor 1 de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Sun et al., 2012, Tajima et al., 2013). Por último, el HC secundario periférico que se caracteriza por alteraciones en los mecanismos de transporte, metabolismo o acción de las HT.

Todos estos casos de HC primario y secundario causan un hipotiroidismo permanente, si no es tratado. No obstante, el HC secundario puede ser transitorio si está causado por factores maternos y neonatales transitorios. Los factores maternos incluyen medicación antitiroidea, anticuerpos anti receptores de tirotropina y exposición a una deficiencia o exceso de yodo. Los factores neonatales incluyen, deficiencia o exceso de yodo, hemangiomas congénitos en el hígado y mutaciones para los genes de codifican DUOX y DUOX2 (Aycan et al., 2017).

Las características clínicas del HC, ya sea primario, secundario central o periférico, frecuentemente son sutiles por lo que muchos recién nacidos no son diagnosticados al nacer. Esto es en parte debido al aporte de HT maternas a través de la placenta, lo que proporciona una protección temporal para el desarrollo cerebral del neonato (Calvo et al., 1990). Además, parte de la tiroides sigue activa en la forma más común de HC, manteniendo una función moderada. Por lo que, debido al lento desarrollo de síntomas clínicos apreciables junto con la importancia de un tratamiento temprano, se han implantado de forma generalizada, programas de cribado para la dección precoz del HC en recién nacidos. Las pruebas se realizan

normalmente entre el segundo y quinto día de vida posnatal, y excepcionalmente, se repiten entre la segunda y sexta semana de edad en algunos programas de cribado. Normalmente, primero se miden los niveles de TSH y si estos son elevados (>9 mU/L), se realiza otro test para ver si los valores de T4 libres han disminuido ($< 0,6$ ng/dL). Este orden puede invertirse dependiendo del centro de salud y de sus programas de cribado. Sin embargo, con ninguno de estos programas se pueden detectar los casos de HC periférico. Para ello, se han realizado ensayos pilotos midiendo a la vez los niveles de T4 libres y TSH en neonatos (Van Tijn Da et al., 2005). Con este tipo de cribado más riguroso ha aumentado la incidencia de HC de 1:3500 a 1:1200 (Deladoey et al., 2011; Albert BB et al., 2012).

1.1.8 Hipotiroidismo posnatal y desarrollo neurológico

En humanos, el HC causa enfermedades neurológicas y psiquiátricas, tales como déficit intelectual, espasticidad y alteraciones en la marcha y la coordinación (Dussault and Ruel, 1987; Rovet et al., 1992; Rovet, 1999; Brown, 2012; Rovet, 2002; Léger, 2015; Krude et al., 2015; Clairman et al., 2015; Aycan et al., 2017). Como resultado de los programas de cribado, los niños con HC detectado tempranamente presentan un desarrollo físico, neurológico y psicológico normal o cercano a la normalidad. Sin embargo, debido a que los niños afectados sufren un circunscrito periodo de insuficiencia de HT, están en riesgo de sufrir daños selectivos (Rovet, 2002). Se ha observado que el desarrollo neuro-psicológico de niños con HC depende del grado de HC, retraso en la detección del mismo y del tratamiento recibido (Heyerdahl y Oerbeck, 2003).

Por lo tanto, estudiar en modelos animales las alteraciones causadas por un déficit posnatal de HT puede ayudar a entender cuál es el sustrato morfo-funcional de alteraciones neuro-psiquiátricas anteriormente citadas.

1.2 Comisuras interhemisféricas

1.2.1 Neocorticogenesis en la rata

En general, los procesos más importantes que tienen lugar durante el desarrollo de la corteza cerebral de los mamíferos son la proliferación y migración de neuronas y glia, y el establecimiento de los circuitos neuronales. Los dos primeros tienen lugar principalmente durante el periodo embrionario, mientras que el tercero se alarga hasta la vida juvenil.

En la rata, la génesis de la corteza cerebral se inicia hacia el día embrionario (E) 12 a partir del neuroepitelio que tapiza dorsalmente las paredes de los ventrículos laterales de las vesículas telencefálicas. Los neuroblastos situados cerca de la superficie dorsal ventricular que dejan de dividirse se convierten en neuronas jóvenes que migran radialmente. La migración radial, se produce siguiendo un posicionamiento “inside-out” (Angevine y Sidman, 1961) en el que las primeras neuronas en migrar ocupan las capas más profundas mientras que las siguientes se añaden a las capas superficiales (excluida capa I). Así las células localizadas en la parte inferior de la corteza son más antiguas que las superficiales (Rakic, 1972; Marin-Padilla, 1990). Estas neuronas se convertirán en neuronas glutamatérgicas (70%). Mientras que las neuronas GABA-érgicas derivan de neuroblastos situados cerca de la superficie ventricular lateral y migran tangencialmente hasta las zonas más mediales del telencéfalo (De Carlos et al., 1996; Jimenez et al., 2002). En ratas, la migración radial comienza alrededor de E13 y el grueso de la misma acaba a E20 (Bayer y Altman, 1991). Mientras que, en los seres humanos, ocurre entre las semanas 6 y 24 de gestación (Marin-Padilla, 1978).

Una vez las neuronas han migrado hasta su posición final desarrollan un patrón de conexión muy específico, estableciendo conexiones con neuronas de su misma área cortical (conexiones intrínsecas), con áreas distintas (conexiones asociativas), ya sea en el mismo hemisferio (conexiones ipsilaterales) o en el hemisferio opuesto (conexiones contralaterales o interhemisféricas), y con áreas subcorticales (conexiones de proyección).

1.2.2 Desarrollo de las comisuras interhemisféricas

En animales con simetría bilateral, la integración de la información proveniente del lado derecho e izquierdo del cuerpo es crucial para procesar funciones sensoriales y motoras. Esto se consigue en el telencéfalo de los vertebrados mediante conexiones entre neuronas telencefálicas localizadas en la sustancia gris, que proyectan sus axones a regiones contralaterales de la corteza, originando las comisuras interhemisféricas.

Las comisuras interhemisféricas además de axones contienen vasos sanguíneos, algunas neuronas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglia). Generalmente los axones forman haces según sus patrones de conexión (Innocenti et al. 2014). La comisura anterior (CA), la comisura hipocámpica y el cuerpo calloso (CC) son las tres más importantes del

telencéfalo. La comisura hipocámpica y la CA reciben axones de áreas del sistema límbico, mientras que el CC recibe axones de áreas neocorticales.

Las comisuras interhemisféricas ya están presentes en el embrión, pero se desarrollan posnatalmente (Innocenti, 1991). La maduración de estas conexiones comprende la formación de proyecciones transitorias, que incluyen conexiones homo- y hetero-tópicas seguidas de apoptosis celular y retracción axonal. En paralelo a la pérdida de conexiones transitorias, los axones que establecen conexiones permanentes aumentan de calibre, se mielinizan algunos de ellos y se desarrollan los árboles terminales funcionales maduros (Innocenti, 1995). Siendo todos estos procesos esenciales para mantener la funcionalidad de las áreas corticales (Stiles y Jernigan, 2010).

En la CA de monos se ha observado una importante pérdida de axones entre el nacimiento y el segundo mes posnatal (La Mantia y Rakic, 1984). Sin embargo, no se han observado dichos cambios en la CA del ratón (Sturrock, 1987) ni de la rata (Guadaño et al., 1994). En el CC de gato, la eliminación de conexiones transitorias tiene lugar entre el final de la gestación y el primer y segundo mes posnatal (Innocenti y Price, 2005) y más del 70% de las conexiones callosas son eliminadas en los primeros meses posnatales (Berbel e Innocenti, 1988). Por el contrario, en el CC de la rata no se ha encontrado esta sobreproducción axonal (Gravel y Hawkes., 1990, Berbel et al., 1994). En humanos, el número de axones en el CC puede estar cerca de su máximo en un cerebro recién nacido, y el proceso de estabilización y maduración axonal ocurre después del nacimiento (Kostovic y Jovanov-Milosevic, 2009).

El proceso de maduración de las conexiones interhemisféricas acaba después de finalizar el proceso de mielinización. (Berbel e Innocenti, 1988). En estudios *in vitro* utilizando nanofibras inertes, se ha visto que los oligodendrocitos pueden mielinizar fibras de más de 400 μm y que por debajo de este diámetro muy pocas aparecen mielinizadas (Lee et al., 2012). Esto demuestra que el calibre podría ser un factor clave para iniciar el proceso de mielinización. Otros procesos cruciales del desarrollo axonal como la actividad funcional podrían ser también determinantes para la mielinización de un axón (Waxman y Swadlow, 1976; Rakic et al., 1986; Innocenti y Berbel, 1991).

La mielinización induce cambios importantes en el contenido de lípidos y proteínas, y en la compactación del tracto. La capa lipídica de la mielina esta compuesta por colesterol, fosfolípidos y glicolípidos en una proporción aproximada de 4:3:2 para la mielina del SNC. Tanto los glicolípidos como el colesterol tienen la capacidad de interactuar con el agua (Barkovich et al., 2000), pudiendo compartimentalizarla (Matsumae et al., 2001). Estas interacciones son importantes para la obtención de imágenes de resonancia magnética (IRM; Barkovich et al., 1988; Kucharczyk et al., 1994). La mielinización ocurre en paralelo a la génesis y maduración de los oligodendrocitos (Thomas et al., 2000). En la CA y CC de la rata, la mielinización comienza después de haberse estabilizado el número total de axones (Gravel et

al., 1990), mientras que en el CC del gato (Berbel e Innocenti, 1988) y mono (LaMantia y Rakic, 1994) comienza después de la fase rápida de pérdida de axones transitorios. A lo largo de este proceso el espacio extracelular que hay entre los axones comisurales disminuye drásticamente lo cual también repercute en las interacciones y compartimentalización de las moléculas de agua. En humanos, la mielinización de las comisuras interhemisféricas tiene lugar desde la segunda mitad del embarazo hasta la adolescencia, aunque presenta un pico durante el primer año posnatal (Miller et al., 2012). La progresión de la mielinización varía entre las distintas regiones del cerebro. En estudios posmortem se ha visto que sigue un patrón caudal-rostral y progresa desde el centro a la periferia, por lo que los tractos sensoriales y motores maduran antes que los de asociación (Brody et al., 1987; Kinney et al., 1988).

1.2.3 Comisura anterior

La formación de la CA de la rata resulta de la unión de 4 haces de axones, dos anteriores, uno posterior y la estria terminalis (De Olmos e Ingram, 1972; Haberly y Price, 1978a, 1978b; Jouandet y Hartenstein 1983; Valverde, 1965; Suárez et al., 2014). La rama anterior (r-ant) recibe axones del núcleo olfatorio anterior, la corteza piriforme anterior y el tubérculo olfatorio (Haberly y Price, 1978a, 1978b; Jouandet y Hartenstein 1983;). La rama posterior (r-post) recibe axones del núcleo amigdaloides lateral y de la corteza piriforme, entorrinal y temporal posterior (Brodal A, 1948; Haberly y Price, 1978b; Jouandet y Hartenstein 1983). La estria terminalis recibe axones del núcleo del tracto olfatorio lateral y de los núcleos de la amígdala basolateral, basomedial y cortical (Haberly y Price, 1978a, 1978b; Turner y Knapp, 1967; Valverde, 1965). En la rata, la principal función de la CA es la transferencia interhemisférica de información olfativa. Sin embargo, en el gato también lleva información somatosensorial y auditiva (Jouandet, 1982). En primates no humanos la CA recibe axones de todo el lóbulo temporal, el área 13 de la corteza orbito-frontal, de las subdivisiones frontal y temporal de la corteza pre-piriforme y de los núcleos profundos y corticales de la amígdala (Demeter et al., 1990). Mientras que en humanos, las áreas de proyección incluyen la parte inferior de los lóbulos temporal y occipital, la convexidad occipital y posiblemente la fisura central y la convexidad prefrontal (Di Virgilio et al., 1999; Patel et al., 2010).

Durante el desarrollo posnatal de la rata, el área transversal de la CA aumenta rápidamente de tamaño siendo la r-ant tres veces mayor a la r-post, en paralelo al aumento del número total de axones entre E18 y P4, que se mantiene prácticamente constante después (Guadaño-Ferraz et al., 1994). La mielinización se inicia alrededor de P12, observándose un aumento rápido del número de axones mielínicos hasta el final del segundo mes y más lento después. El diámetro medio de los axones mielínicos aumenta con la edad empezando a mielinizarse los de mayor calibre (Guadaño-Ferraz et al., 1994, Berbel et al., 1994).

1.2.4 Importancia de las HT en el desarrollo de las comisuras interhemisféricas

El déficit de HT afecta a la migración neuronal, la cito-arquitectura cortical y la distribución y maduración de las conexiones. Las alteraciones en estos procesos tienen consecuencias en el desarrollo del cerebro y, en particular, en el de las comisuras interhemisféricas.

Se ha estudiado la migración radial durante la cortico-génesis en el cerebelo y corteza cerebral de ratas hipotiroideas (Bernal, 2005; Goodman y Gilbert, 2007; Berbel et al., 2007). En las áreas corticales auditiva y somato-sensorial, se observó una alta proporción de neuronas ectópicas en la sustancia blanca subcortical aisladas (Lucio et al., 1997; Berbel et al., 2001) y formando agrupaciones (Goodman y Gilbert, 2007). La presencia de neuronas ectópicas en la sustancia blanca subcortical muestra claramente una alteración de la migración celular durante la corticogénesis. En las ratas hipotiroideas adultas, los bordes entre capas de la neocorteza son difusos (Berbel et al., 1993). Estos cambios son más visibles en la corteza somato-sensorial, donde el tamaño de barriles es un 23% menos en las ratas hipotiroideas en comparación con las normales (Berbel et al., 2001).

Aunque la proliferación y migración celular es uno de los factores más importantes que afectan la corticogénesis, también lo son otros factores como el deterioro en la maduración neuronal y la conectividad cortical (Ausó et al., 2001). La distribución radial de las fibras aferentes talámicas en la capa de los barriles de ratas hipotiroidea, es similar entre ratas normales e hipotiroideas. Sin embargo, los áboles axónicos terminales en ratas hipotiroideas tienen un área de proyección menor y siguen trayectorias más erráticas (Ausó et al., 2001). Las conexiones intrínsecas de la corteza auditiva están afectadas en ratas hipotiroideas, disminuyendo el número de terminales inmunoreactivos a parvalbumina (principalmente perisomáticos) en las capas II-VI respecto a las ratas normales (Berbel et al., 1996). Además, en ratas hipotiroideas adultas, el número total de axones en la CA (Guadaño-Ferraz, et al., 1994) y del cuerpo CC (Gravel et al., 1990) no está afectado pero si lo está el número de axones mielínicos (Gravel y Hawkes, 1990; Berbel et al., 1994), en la CA de las ratas hipotiroideas a P180, una reducción del 66% en el número de axones mielínicos con respecto a las ratas controles (Berbel et al., 1994).

El proceso de mielinización en las comisuras también depende de la génesis y maduración de los oligodendrocitos (Thomas et al., 2000). Estudios *in vitro* han demostrado que la T3 regula la transcripción de genes involucrados en la diferenciación de los oligodendrocitos humanos y de ratón, mediante la unión a $THR\alpha 1$ (Farsetti et al., 1991; Tokumoto et al., 2001; Billon et al., 2002; Billon et al., 2004; Fernández et al., 2004; Dugas et al., 2012). En ratas hipotiroideas neonatales, se ha encontrado alterada la expresión de genes tales como la proteína básica de mileina y la proteína proteolípica de la mielina, la CNPasa y la glicoproteína asociada

a la mielina (Rodríguez-Peña et al., 1993; Ibarrola y Rodríguez-Peña 1997; Barradas et al., 2001). Por último, estudios recientes muestran que las HT regulan la angiogénesis de la materia blanca, activando la vía del factor inducible por hipoxia 1α . Este proceso es crítico para el mantenimiento de células comisurales, incluyendo los axones y los oligodendrocitos (Yuen et al., 2014).

1.2.5 Enfermedades neurológicas y psiquiátricas en humanos, asociadas a alteraciones de las comisuras telencefálicas

Se han asociado alteraciones en la conectividad interhemisférica con el desarrollo neurocognitivo durante la infancia y la adolescencia (Schumann et al., 2004; Goodman et al., 2014; Wheeler et al., 2015) y con desórdenes mentales y trastornos de ansiedad generalizados (Shin y Liberzon, 2010; Tromp et al., 2012; Green et al., 2016), dislexia (Hynd et al., 1995), trastornos del espectro autista (Bauman y Kemper, 2005; Schumann y Amaral, 2006; Bellani et al., 2013), TDAH (Priven et al., 1997, Li et al., 2014a,b), esquizofrenia (Innocenti et al., 2003; Santos et al., 2012; Guo et al., 2013; Mukherjee et al., 2014; Kikinis et al., 2015), trastorno de depresión mayor (Bellani et al., 2011) y trastornos bipolares (McIntosh et al., 2009; Özerdem et al., 2016). Recientemente, se han observado alteraciones en IRM de las comisuras interhemisféricas de niños nacidos de madres tratadas por hipotiroidismo durante diferentes periodos del embarazo, revelando la importancia de las HT maternas para el correcto desarrollo de las conexiones interhemisféricas (Samadi et al., 2015). También, se han utilizado para medir el volumen del hipocampo en ratas y humanos hipotiroideos, durante el desarrollo (Hasegawa et al., 2010; Wheeler et al., 2011).

El estudio de la CA es muy importante porque conectan a través de ella áreas telencefálicas relacionadas con la olfacción y la conducta emocional. En biopsias de pacientes, se han encontrado alteraciones en la sustancia blanca en pacientes con esquizofrenia y trastornos bipolares, (Brambilla et al., 2009; Saxena et al., 2012; Marlinge et al., 2014; Bora, 2015a,b) y un aumento del número de oligodendrocitos apoptóticos en la corteza prefrontal (Uranova et al., 2001; Vostrikov et al., 2007). Mientras que las biopsias de la corteza basolateral frontal de pacientes esquizofrénicos muestran una disminución de la densidad de espinas en las dendritas basales de las neuronas piramidales de la capa III, reflejando que las aferencias de la capa III están atrofiadas, incluidas las comisurales (Lewis et al., 2013). Estas alteraciones se han confirmado con estudios usando IRM, observándose alteraciones comisurales en pacientes que sufren trastornos bipolares (Walterfang et al., 2009; Saxena et al., 2012), esquizofrenia (David et al., 1993) y autismo (Just et al., 2000). IRM ofrece un método para observar *in vivo* el desarrollo de ciertas estructuras, su potencial deterioro frente a una determinada situación experimental y la recuperación eventual del daño tras un tratamiento adecuado. Además, es una excelente herramienta para estudiar las comisuras interhemisféricas, puesto que los tractos

axonales modifican los niveles de resonancia según su estado morfo-funcional (Chandran et al., 2012; Powell et al., 2012; Thiessen et al., 2013; Alonso-Ortiz et al., 2015; Jelescu et al., 2016).

Con microscopia electrónica (ME) se ha descrito en ratas adultas con hipotiroidismo crónico desde E12, un descenso drástico en el número de axones mielínicos presentes en la CA y en el CC (Gravel y hawkes, 1990; Berbel et al., 1994). Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado con IRM el efecto del hipotiroidismo en el desarrollo posnatal de las comisuras telencefálicas y en particular de la CA, determinando distintos periodos críticos sensibles a una posible recuperación tras un tratamiento adecuado. En particular, sería muy importante conocer en detalle cambios en la maduración de las comisuras telencefálicas causadas por un déficit de HT durante la lactancia, usando IRM *in vivo* y su relación con posibles alteraciones ultraestructurales estudiadas con ME.







2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2.1 Hipótesis generales

Nuestra principal hipótesis es que la carencia de HT durante el periodo de lactancia y posnatal temprano afecta la maduración de las conexiones de la CA de las crías, y que estas alteraciones se pueden detectar con IRM. Además, un tratamiento tardío con T4 no revierte el posible daño causado.

Se pueden correlacionar datos obtenidos con IRM con datos cuantitativos publicados con ME, relacionados con la compactación del tejido tales como aumento del calibre de los vasos y grado de mielinización. Consecuentemente, se pueden obtener funciones de regresión que permiten estimar datos cuantitativos sobre axones comisurales en otras condiciones experimentales.

Con ME, se observarán cambios en el desarrollo de las comisuras de todos los grupos experimentales a P150. Como estos grupos han sido previamente estudiados con IRM, podremos verificar el ajuste de las estimaciones obtenidas.

Los datos obtenidos ayudarán a explicar alteraciones neurológicas asociadas al HC. Además, se aportarían evidencias para el diagnóstico y tratamiento de la disfunción tiroidea del neonato. Un diagnóstico y tratamiento preventivo precoz evitará un retraso en la maduración de las comisuras telencefálicas del niño, reduciendo el riesgo de sufrir alteraciones neurológicas y contribuirá a aumentar su calidad de vida.

2.2 Objetivos específicos

- 1. Estudiar usando IRM alteraciones durante el desarrollo posnatal de la CA en ratas con hipotiroidismo crónico (gestacional y posnatal) y transitorio (posnatal durante la lactancia).**
- 2. Verificar usando IRM si un tratamiento con T4 a madres hipotiroideas transitorias al final de la lactancia (de P15 hasta P21) revierte el daño producido en la CA.**
- 3. Correlacionar los datos de IRM obtenidos con datos publicados previamente referentes al número y porcentaje de axones mielínicos y número de axones amielínicos de la CA. Obtener las ecuaciones de regresión que permitan estimar valores referentes al grado de maduración de la CA a partir de IRM.**
- 4. Calcular valores estimados de número y porcentaje de axones mielínicos en los distintos grupos estudiados y compararlos con los obtenidos con ME a P150.**
- 5. Cuantificar con microscopía óptica (MO) el aumento de área y con ME la densidad y diámetros de axones, espesor de la vaina de mielina y el cociente g en la CA de las ratas C e hipotiroideas (crónicas y transitorias).**
- 6. Calcular la velocidad y retraso en la conducción de las áreas contralaterales homotópicas que proyectan a través de la CA.**





3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Animales de experimentación

Utilizamos ratas de la cepa *Wistar* mantenidas en las instalaciones del animalario del Campus de San Juan de la Universidad Miguel Hernández, sometidas a un control veterinario bajo supervisión de un comité ético y cumpliendo las directrices de la Unión Europea. Las ratas están a una temperatura de 22-24°C y a ciclos alternativos de 14 horas de luz y 10 de oscuridad.

En nuestro estudio, el día de la aparición del tapón vaginal se considero E0 y el día del nacimiento P0, ocurrió entre E21-23. El periodo de lactancia comprende desde P0 a P21. A P2-3 las camadas se igualaron a 8 crías. A partir de P21, las crías que no se utilizaron (hembras), fueron anestesiadas mediante inhalación de isoflurano al 1,5-2% (Laboratorios Dr. Esteve, S.A., Barcelona, España) en O2 (0,9 L O2/min) y sacrificadas por decapitación. En todos los grupos se han utilizado animales de la misma edad, sexo (machos) y peso similar.

Para inducir el hipotiroidismo, se añadió en el agua de bebida methimazole (MMI, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) al 0,02%. Adicionalmente, se añadió perclorato potásico (KClO₄) al 1% en el agua de bebida hasta P21, para bloquear la función tiroidea fetal y de las crías lactantes. El MMI y el KClO₄ inhiben la síntesis de HT de manera diferente. Por un lado, el KClO₄ inhibe el transporte de yoduro al interior del tirocito y de la glándula mamaria, mientras que el MMI impide la oxidación del yoduro y la incorporación de este a los residuos de tirosina de la tiroglobulina (Morreale de Escobar et al., 1989). En función del inicio y duración del tratamiento se han obtenido 5 grupos experimentales (Figura 3) que se detallan a continuación:

Grupo Control (C). Ratas eutiroideas, mantenidas con agua de bebida sin MMI.

Grupo MMI_{E10}. Hipotiroidismo materno y de las crías durante la gestación y posnatal: El hipotiroidismo materno, fetal y neonatal se ha inducido administrando a ratas gestantes MMI desde E10 hasta el día de sacrificio de las crías a P150 para ME y a P170 para IRM.

Grupo MMI_{P0}. Hipotiroidismo materno y de las crías durante el periodo posnatal: Tratamiento con MMI desde P0-150.

Grupo MMI_{P0-21}. Hipotiroidismo materno y de las crías durante la lactancia: A las madres y crías se les ha tratado con MMI desde P0 hasta P21 (día del destete).

Grupo MMI_{P0-21}+T4_{P15-21}. Ratas MMI_{P0-21} tratadas con T4 de P15-21. La T4 se administró subcutáneamente, mediante el uso de pico-bombas osmóticas colocadas quirúrgicamente en la zona escapular, con una tasa de liberación de 1 µL/h/día (ALZET, model 2001; Alza Corporation, Mountain View, CA).

A lo largo del texto, los grupos MMI_{P0-21}+T4_{P15-21} y MMI_{P0-21} se referirán como ratas hipotiroideas transitorias, excepto cuando se encuentren diferencias significativas entre ellos. De la misma forma, los grupos MMI_{P0} y MMI_{E10} se referirán como ratas hipotiroideas crónicas.

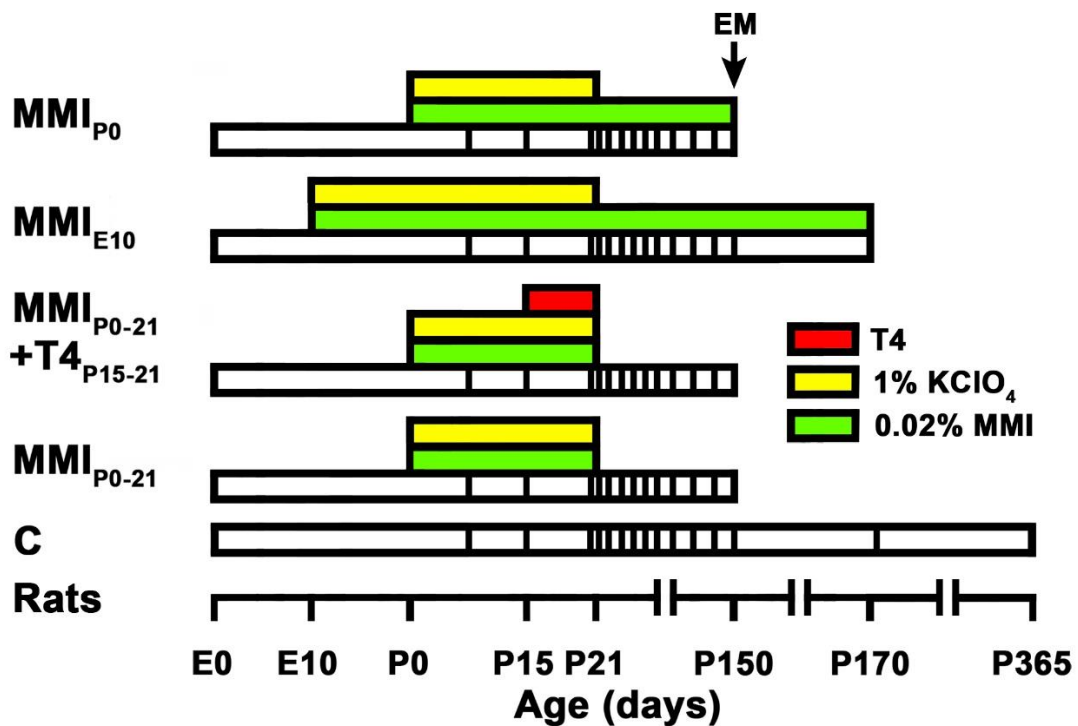


Figura 3. Grupos experimentales y tratamientos. El dibujo muestra los grupos experimentales estudiados. Las barras horizontales muestran los distintos tratamientos, las barras blancas muestran el tiempo en el que estuvieron vivos y en la parte inferior una escala de tiempo. Las barras verticales dentro de las barras blancas muestran la edad en la que se hicieron los escáneres de IRM. El hipotiroidismo fue inducido añadiendo en el agua de bebida metimazol al 0,02% (MMI; barras verdes). La T4 (barra roja) fue administrada subcutáneamente mediante el uso de mini bombas osmóticas (tasa de liberación de 1 $\mu\text{L/h/day}$). Los grupos MMI fueron tratados con MMI desde la edad indicada hasta el día de sacrificio (fin de barra blanca). El grupo $\text{MMI}_{\text{P0-21}}+\text{T4}_{\text{P15-21}}$ fue tratado de manera adicional con T4 de P15-21. Todas las crías tratadas con MMI también se trataron con 1% KClO_4 (barras amarillas) hasta P21, para bloquear la función tiroidea durante el periodo fetal y la lactancia. Cuatro crías (1 por camada) de cada grupo experimental se sacrificaron a P150 y se estudiaron con ME. Todas las crías se escanearon con IRM a la edad de P150 antes del sacrificio, con excepción de las ratas C y MMI_{E10} que no se usaron para EM, las cuales se siguieron escaneando con IRM en las edades indicadas.

3.2 Control del hipotiroidismo

Bajo anestesia con isofluorano (Laboratorios Dr. Esteve, S.A., Barcelona, España), 8 ratas macho por grupo (2 por camada) se pesaron y se les extrajo sangre del corazón (aprox. 1 mL) a P15, P21 y P50. Para ello, se usó una aguja heparinizada al 0,17% en solución salina estéril, una vez extraída la sangre se centrifugó durante 20 min a 2000 rpm y se recogió el plasma, almacenándose a -20°C hasta el momento de las determinaciones de los niveles totales de T3 (T3t) y T4 (T4t), realizadas mediante radioinmunoensayo (Morreale de Escobar et al., 1985).

3.3 Microscopia electrónica

Cuatro ratas por grupo (1 por camada) fueron procesadas para ME a la edad de P150. Todos los animales se anestesiaron mediante inhalación de isofluorano al 1,5-2% en O₂ (0,9 L O₂/min) y se perfundieron con solución salina (NaCl al 0,009%), seguido de paraformaldehído al 4%, glutaraldehído al 1%, 0,1M de sacarosa y CaCl₂ al 0,002% en buffer fosfato (PB; pH: 7,3-7,4) 0,1M. Los cerebros se posfijaron por inmersión en la misma solución fijadora a 4°C durante la noche, se extrajeron y se cortaron sagitalmente con un vibratomo en rodajas de 250 µm de espesor. Las dos rodajas más mediales de cada hemisferio se posfijaron en OsO₄ al 2% durante 30 min a temperatura ambiente y se tiñeron con acetato de uracilo al 2% en oscuridad, durante 1 h a 4°C, se deshidrataron en etanol, se sumergieron en óxido de propileno (Lab Baker, Deventry, Holland) y se incluyeron en araldita durante toda la noche (Durcupan, Fluka, Buchs SG, Switzerland). Después, se hicieron cortes semi-finos (1,5 µm) con un ultramicrotomo (Ultracut UC-6, Leica, Heidelberg, Germany) y se tiñeron con azul de toluidina al 1%. Los cortes ultrafinos (80-70 nm) se tiñeron con citrato. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio electrónico de transmisión (FEI Tecnai Spirit G2, Eindhoven, The Netherlands), usando una cámara digital (Morada, Soft Imaging System, Olympus). En la CA, se tomaron 6 fotomicrografías equidistantes con ME en la rama anterior (r-ant) y 4 en la posterior (r-post; Figura 9, círculos negros) a 16.500x.

3.4 Estudio morfométrico de los axones de la comisura anterior

Con el microscopio óptico, se fotografiaron los cortes semi-finos teñidos con azul de toluidina y se midió el área transversal de la CA.

Con las fotos de ME se ha obtenido la densidad de axones, el diámetro interno de los axones mielínicos y amielínicos y el diámetro externo de los mielínicos (i.e.: diámetro interno más el ancho de la vaina de mielina) a partir de los trazados dibujados usando el software “Cellgraph” (Microptic S.L., Barcelona, Spain). El número total de axones en la r-ant y r-post fueron calculados multiplicando la media de la densidad de axones en cada rama por su correspondiente área transversal. Además, hemos calculado el cociente entre el diámetro interno y el externo de los axones mielínicos (cociente g) así como la velocidad de conducción (v) como 5,5 veces el diámetro externo (Innocenti, 2017).

A partir de las IRM (Figura 4), hemos calculado las distancias entre algunas de las áreas que proyectan contra-lateralmente a regiones homotópicas a través de la r-ant (tubérculo olfatorio y la corteza piriforme anterior) y de la r-post (corteza perirhinal y piriforme posterior y el núcleo amigdaliano lateral) de la CA (Figura 15, tabla 5). También se han calculado los retrasos en la conducción entre las áreas homotópicas (Figura 15, Tabla 6).

Debido a un posible encogimiento de los cerebros de las ratas MMI respecto a las C, se han buscado referencias anatómicas para identificar niveles equivalentes entre los distintos grupos (Figura 4). Para las áreas que proyectan por la r-ant, se tomo como referencia cuando la rama antero-lateral de la r-ant empieza a aparecer cortada transversalmente (alrededor de 1,89 mm de Bregma en las ratas C; a este nivel, el tubérculo olfatorio y la corteza piriforme anterior estuvieron presentes en las ratas C y MMI). Para las áreas que proyectan por la r-post, la referencia fue cuando los núcleos habenuares empiezan a aparecer (alrededor de -3,36 mm de Bregma en las ratas C; a este nivel las cortezas perirrinal y piriforme posterior y el núcleo amigdalino lateral están presentes). Considerando que el ancho de las IRM es de 500 μm , se estima un error en el cálculo de la distancia de aproximadamente 250 μm por hemisferio.

3.5 Adquisición y procesamiento de las imágenes de resonancia magnética

Para la adquisición de las IRM las ratas fueron anestesiadas, primero en una cámara de inducción con isoflurano al 3-4% en aire (0,8-1 L/min) y después se mantuvieron al 2% durante el escaneado.

La cabeza de las ratas se inmovilizó mediante una barra en los dientes y unos conos en las orejas. Esto permitió evitar artefactos por movimiento y colocar de manera precisa a los animales con respecto a la bobina y al imán. Durante el escaneado se monitorizó la frecuencia cardíaca y la temperatura corporal, que se mantuvo alrededor de los 37°C con una manta térmica. La adquisición de las imágenes se llevo a cabo en un escáner horizontal de 7 Teslas con un diámetro de 30 cm (Biospec70/30v, Bruker Medical, Germany). El equipo tiene una bobina de gradiente de 675 mT/m (Bruker, BGA 12-S) con un diámetro interno de 11,4 cm.

Considerando el diámetro antero-posterior de la CA (en promedio, pasa de medir 505 μm en ratas MMI_{E10} a P8 a medir 850 μm en ratas C a P365) y el ancho de cada IRM (500 μm), la selección correcta del plano coronal de estudio ha sido crucial para evitar un solapamiento con la materia gris que pudiera estar por delante o por detrás de la CA. Para esto, se obtuvieron imágenes preliminares en 3D ponderadas en T_2 (T_{2p}), usando la secuencia rápida de adquisición de spin-echo con aumento de la relajación (RARE-8), aplicando los siguientes parámetros: campo de vision 40 x 40 mm, 15 imágenes, grosor de la imagen 1 mm, matriz 256 x 256, tiempo de echo efectivo 56 ms, tiempo de repetición 2000 ms, y un tiempo total de adquisición de 1 min 4 s (Hennig et al., 1986; Hennig y Friedburg, 1988). Las T_{2p} óptimas para el estudio de las comisuras, se obtuvieron en el plano coronal (también se adquirieron parasagitales en las ratas a P150) usando la secuencia RARE-8 con los siguientes parámetros: campo de visión 20 x 20 mm, 25 imágenes, grosor de la imagen 0,5 mm, matriz 200 x 200 (resolución del pixel 100 x 100 x 500 μm^3), tiempo de echo efectivo 56ms, tiempo de repetición 3728 ms, promediado 4 veces y un tiempo total de adquisición de 12 min 26 s.

Se han obtenido IRM de 8 ratas por grupo (2 por camada) a edades entre P0 y P365 (mirar las barras verticales negras en la figura 3 y la tabla 2 para detalles) y se han analizado usando el software “ImageJ” (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). La región de interés (RDI) de la CA contiene la porción medial de la CA, ubicada a $\pm 0,7$ mm de la línea media (Figura 5, líneas verticales blancas en P150C). Los cocientes de T_2 (T_{2r}) se han calculado dividiendo la señal de T_{2p} de la RDI con la del líquido cerebro espinal del ventrículo lateral.

3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado usando el software GraphPad Prism 5 (www.graphpad.com). Para la concentración de hormonas circulantes, los valores de T_{2r} , el número y porcentaje de axones mielínicos, el número de axones amielínicos, el diámetro interno de los mielínicos y amielínicos, el ancho de las vainas de mielina, el cociente g, la velocidad de conducción, la distancia entre las áreas de proyección y el retraso en la conducción, se ha realizado el test de ANOVA de una vía seguido del “test de Tukey” para identificar diferencias significativas entre las medias. El nivel de significación estadística se estableció en $P \leq 0,05$ (*); $P \leq 0,01$ (**); $P \leq 0,001$ (***)).

Se han correlacionado los valores de T_{2r} con los parámetros cuantitativos previamente publicados con ME (número y porcentaje de axones mielínicos) y el ancho de la vaina de así como el cociente g, con el diámetro de los axones mielínicos. Para esto, se ha realizado el análisis de correlación, calculando el coeficiente de correlación de Pearson (r). Posteriormente, se ha realizado un análisis de regresión y calculado el coeficiente de determinación (R^2).

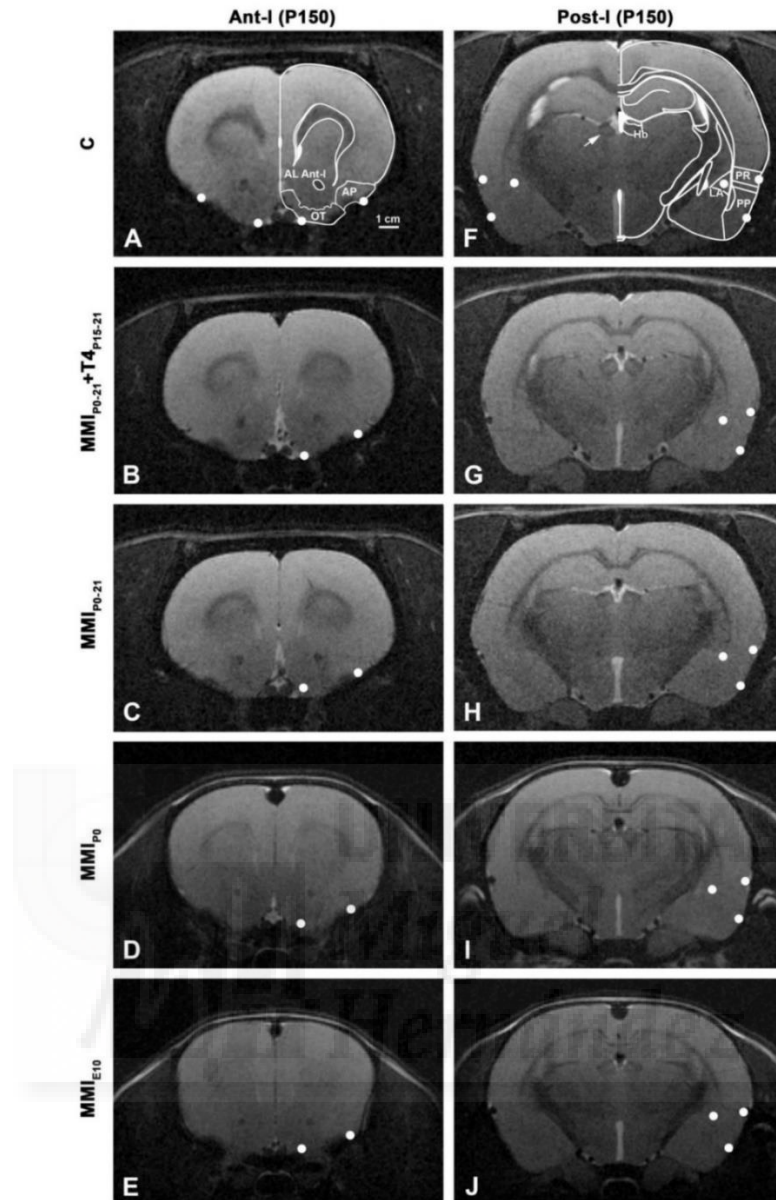


Figura 4. Imágenes de IRM mostrando las RDI de las áreas telencefálicas que proyectan a través de la CA. Imágenes T_{2p} (A-J) de secciones coronales del cerebro de ratas MMI y C a P150 mostrando la selección de áreas que proyectan a través de la CA. **A,F.** Contornos mostrando los límites de las áreas seleccionadas en las ratas C, de acuerdo con Paxinos et al., 2015. A 1,89 mm de Bregma en las ratas C, la rama antero-lateral (AL) de la r-ant empieza a aparecer cortada transversalmente. Esta ha sido la referencia anatómica para las ratas MMI. A este nivel, se puede observar el tubérculo olfatorio (OT) y la corteza piriforme anterior (AP) en las ratas C y MMI (B-E). A -3,36 de Bregma en las ratas C (F), el núcleo habenular lateral y medial (Hb) aparece más oscuro que el neuropilo adyacente (flecha). Esto se ha tomado como referencia para las ratas MMI. A este nivel, las cortezas perirrinal (PR) y piriforme posterior (PP) y el núcleo amigdalóide lateral (LA) pueden verse en las ratas C (F) y en las MMI (G-J). Las distancias contralaterales se han medido entre las regiones de interés homotópicas (RDIs; puntos) localizadas en la superficie de la pia de la zona media de las áreas seleccionadas y de las zonas centrales de la LA. Misma escala para todas las figuras.



4. RESULTADOS



4.1 Peso corporal y nivel de hormonas tiroideas

El peso corporal ha aumentado rápidamente hasta alcanzar un valor promedio de 400 ± 20 g en las crías C e hipotiroideas transitorias, aumentando más lentamente después en las ratas C (446 ± 13 g a P365). En las crías hipotiroideas crónicas, el peso corporal ha sido significativamente inferior al resto de grupos (en promedio, 75 ± 25 g; $P < 0,001$; Figura 5A).

A P15, los niveles plasmáticos de T4t (en promedio $7,2 \pm 0,9$ ng/ml) y T3t (en promedio $0,05 \pm 0,01$ ng/ml) en las ratas MMI han sido significativamente inferiores ($P < 0,001$) a los de las ratas C ($40,1 \pm 5,8$ ng T4t/ml y $0,26 \pm 0,03$ ng T3t/ml; Figuras 5B,C; Tabla 1). A P21, los niveles de T4t y T3t de las ratas MMI_{P0-21}+T4_{P15-21} alcanzan los valores de las ratas C, y a P50 los alcanzan los de las ratas MMI_{P0-P21} (Figuras 5B,C; Tabla 1).

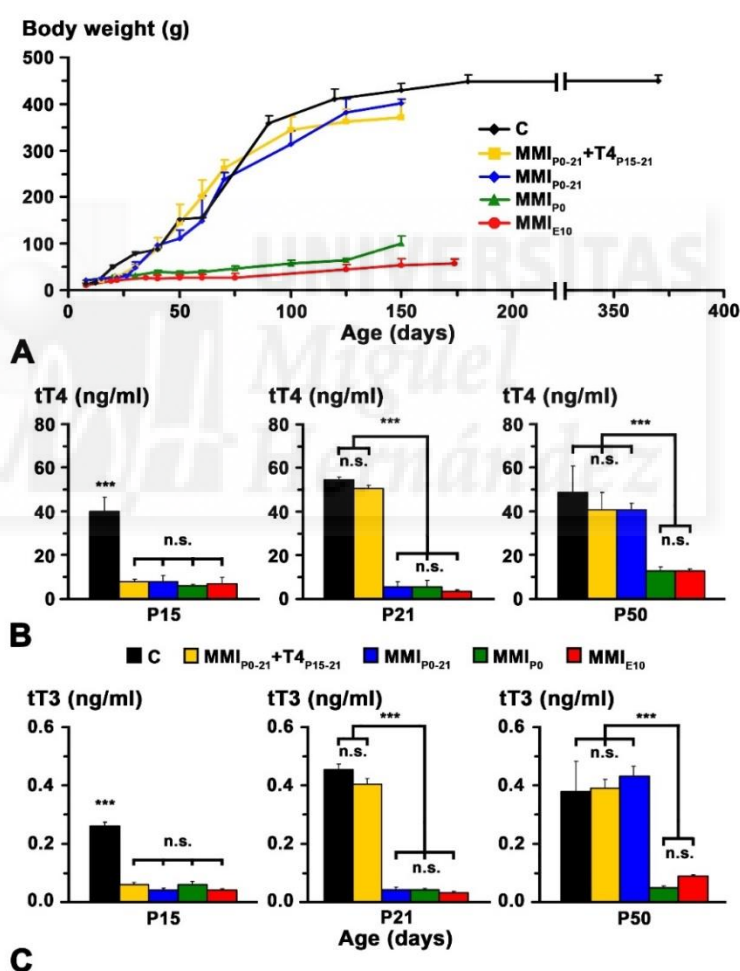


Figura 5. Peso corporal y niveles de HT en plasma. A. Evolución del peso corporal con la edad en las ratas C y MMI. Nótese el menor crecimiento de las ratas MMI_{P0} y MMI_{E10}. B,C. Los diagramas de barras muestran las concentraciones de T4t y T3t a las edades indicadas. Las concentraciones de HT están recuperadas en las ratas hipotiroideas transitorias a P50. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. n.s.: diferencias no significativas; *** $P \leq 0,001$ (n = 8-11 ratas por grupo).

Tabla 1. Concentración total de hormonas en plasma.

Edad (días)	C	MMI _{P0-21} +T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
T4t (ng/ml)					
P15	40,1 ± 5,8	7,8 ± 0,4	8,2 ± 1,0	5,9 ± 0,1	6,9 ± 1,0
P21	54,9 ± 3,5	50,9 ± 2,6	5,9 ± 1,5	5,6 ± 2,7	4,3 ± 0,1
P50	49,0 ± 12,5	41,3 ± 7,8	41,2 ± 3,4	12,7 ± 2,5	13 ± 0,5
T3t (ng/ml)					
P15	0,26 ± 0,03	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,01
P21	0,46 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
P50	0,38 ± 0,10	0,39 ± 0,06	0,42 ± 0,07	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,01

Los datos representan la media ± la desviación estándar.

4.2 Estudio de la CA con IRM

En los escáneres T_{2p}, a edades tempranas la CA aparece más clara que el neuropilo adyacente, tanto en las ratas C como en las MMI, haciendo prácticamente indetectable la CA. Los T_{2r} decrecen progresivamente con la edad, y cuando los T_{2r} son ≤ 0,45, lo cual ocurre a P22 en las ratas C y a edades superiores en las MMI, el contraste y la nitidez de los límites de la CA aumentan (flechas y líneas gruesas en la figura 6A,B, respectivamente: tabla 2). La CA apenas se distingue en las ratas MMI_{P0} a P40 y en las MMI_{E10} a P60 (cabezas de flechas en la figura 6A). En las ratas C, los T_{2r} disminuyeron rápidamente de P8 a P40 y más despacio después (T_{2r} = 0,21 a P365). Los T_{2r} también disminuyen rápidamente en las ratas tratadas con MMI, pero permanecen más altos que los de las ratas C (Figura 6B, C; Tabla 2).

A P40, se han encontrado diferencias significativas entre los T_{2r} de las crías MMI_{P0-21}+T4_{P15-21}, MMI_{P0-21} y MMI_{P0} (P < 0,05) y las diferencias aumentan (P < 0,001) respecto a las C y MMI_{E10} (Figura 6C; Tabla 2). A P150, los T_{2r} son similares en las ratas hipotiroideas transitorias y diferentes a los de las ratas C (P < 0,05), MMI_{P0} (P < 0,05) y MMI_{E10} (P < 0,001; Figura 6C; Tabla 2). Estos datos muestran que la maduración de la CA está retrasada, al menos hasta P150, en las ratas tratadas con MMI.

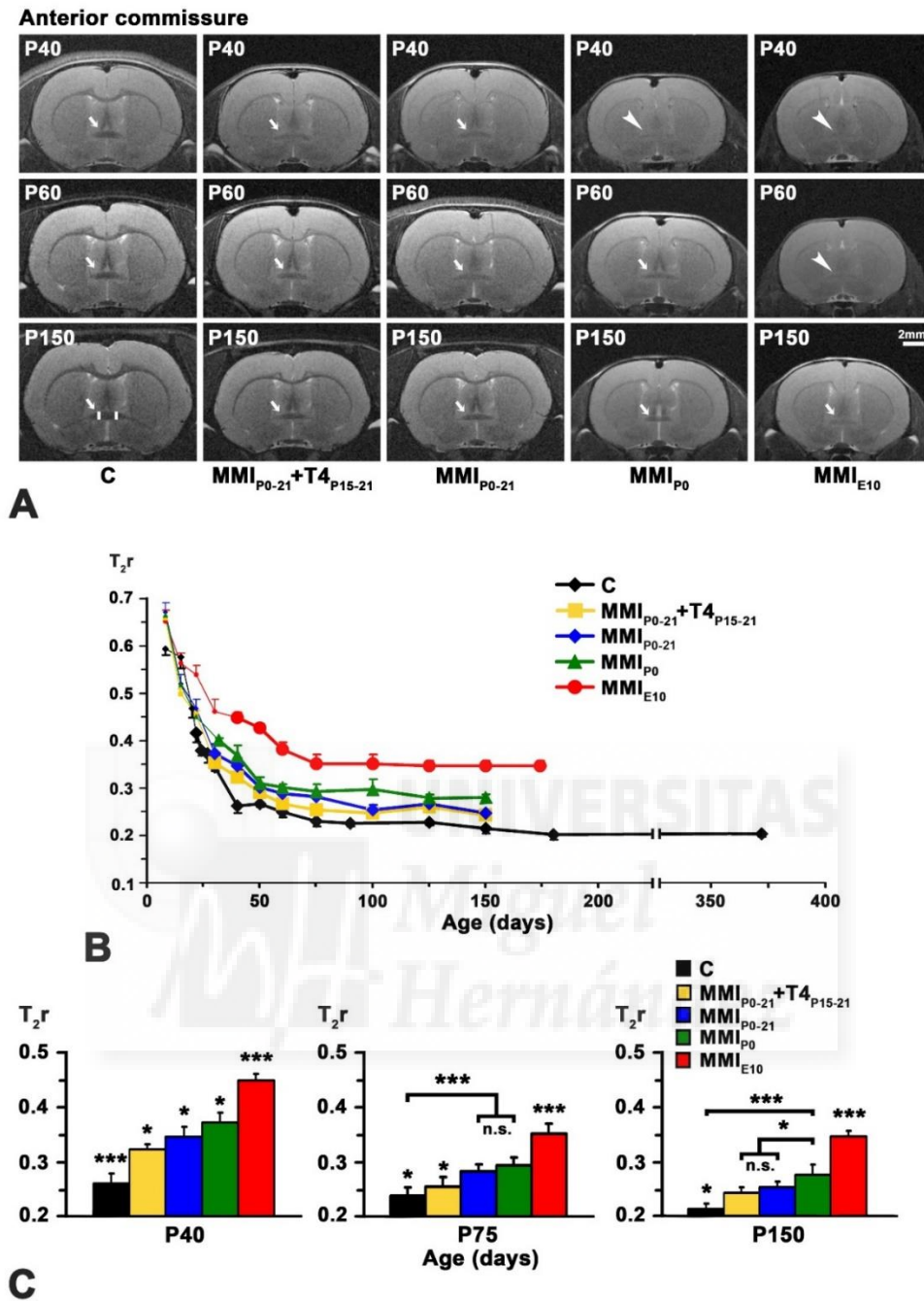


Figura 6. IRM y T_{2r} de la CA a distintas edades posnatales. **A.** A todas las edades, las T_{2p} de la CA (flechas y puntas de flecha) de las ratas MMI han estado menos contrastadas que las C (las puntas de flecha apuntan CA no distinguibles). La CA permaneció apenas detectable en las ratas hipotiroideas crónicas a P150 (flecha). Se muestra una RDI (área entre las barras verticales blancas) de la CA en las ratas C a P150. **B.** Evolución de los T_{2r} a distintas edades posnatales; los puntos gruesos muestran valores de T_{2r} cuando la CA es más oscura que el neuropilo adyacente. En las ratas C, el T_{2r} decreció rápidamente desde P8 hasta P50 y más despacio después. Las ratas MMI mostraron una tendencia similar, pero con valores de T_{2r} mayores a los de las ratas C. **C.** Histogramas de barras mostrando T_{2r} a las edades indicadas. En todas las edades, el T_{2r} fue significativamente mayor en las ratas MMI que en las C. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. n.s.: diferencias no significativas; $P \leq 0,05$ *** $P \leq 0,001$ (n = 8 ratas por grupo).

Tabla 2. Valores de T_{2r} en la CA a diferentes edades posnatales.

Edad (días)	C	MMI _{P0-21} +T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
P8	0,59 ± 0,01 ^a	0,66 ± 0,02 ^a	0,67 ± 0,02 ^a	0,66 ± 0,02 ^a	0,65 ± 0,02 ^a
P15	0,57 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,02 ^a	0,52 ± 0,03 ^a	0,56 ± 0,02 ^a
P20	0,47 ± 0,02 ^b				
P22	0,42 ± 0,02	0,45 ± 0,01 ^b	0,47 ± 0,02 ^b	0,45 ± 0,02 ^b	0,54 ± 0,02 ^b
P24	0,38 ± 0,01				
P27	0,37 ± 0,02				
P30	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,40 ± 0,01 ^c	0,46 ± 0,02 ^b
P40	0,26 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,02 ^c	0,44 ± 0,01 ^c
P50	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,01 ^c	0,43 ± 0,01 ^c
P60	0,25 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,38 ± 0,02 ^c
P75	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,35 ± 0,02
P100	0,23 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,35 ± 0,02
P125	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,35 ± 0,01
P150	0,22 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,35 ± 0,01
P180	0,20 ± 0,01				0,35 ± 0,01
P365	0,21 ± 0,01				

Los datos representan la media ± la desviación estándar. a: la CA tiene el mismo contraste que el neuropilo adyacente. b: la CA tiene el mismo contraste que el neuropilo adyacente. c: la CA es ligeramente más oscura que el neuropilo adyacente. Los valores restantes corresponden a CA más oscuras que el neuropilo adyacente.

4.3 Correlación entre valores de T_{2r} y datos cuantitativos de ME

Usando datos cuantitativos de ME obtenidos en la CA de ratas C durante diferentes edades posnatales (Berbel et al., 1994; Tabla 3), hemos encontrado una correlación significativa entre los T_{2r} y el número ($R^2 = 0,96$; Figuras 7A,B) y porcentaje ($R^2 = 0,96$; Figuras 7C,D) de axones mielínicos. Sin embargo, el número de axones amielínicos presenta una correlación pobre con los T_{2r} ($R^2 = 0,79$; Figuras 7E,F).

Usando las funciones de regresión obtenidas con las ratas C hemos estimado el número y porcentaje de axones mielínicos para las ratas MMI_{E10}, a partir de sus valores de T_{2r} . No se han encontrado diferencias significativas entre los valores estimados para las ratas MMI_{E10} y los publicados (grupos MMI_{E10} y MMI_{E10}+T_{P6}; Berbel et al., 1994; Figuras 8A,B). Además, usando las funciones de regresión obtenidas en las ratas C, también hemos estimado el número y porcentaje de axones mielínicos en los otros grupos de ratas tratadas con MMI. A P150, las estimaciones muestran una disminución significativa en el número de axones mielínicos en las ratas hipotiroideas transitorias (17,0%), MMI_{P0} (36,8%) y MMI_{E10} (65,9%) respecto a las C (Figura 8C). También se ha estimado una disminución significativa del porcentaje de axones mielínicos entre las ratas MMI y C (Figura 8D).

Tabla 3. Datos cuantitativos de la CA, obtenidos con ME a diferentes edades posnatales.

Edad (días)	Amiel. ax. no. ($\times 10^3$)	Miel. ax. no. ($\times 10^3$)	Miel. ax. %
C			
P8	-	-	-
P12	1152.4	3.3	0.3
P17	955.4	20.3	2.1
P20	1127.2	61.2	5.2
P27	1079.9	105.1	8.9
P60	881.6	186.9	17.5
P125	679.5	283.3	29.4
P150	679.2	283.9	29.7
P180	655.0	309.4	32.1
P365	627.2	387.4	38.2
MMI_{E10}			
P8	978.8	-	-
P15	847.5	27.7	3.2
P22	1121.9	28.3	2.5
P30	1069.5	78.2	6.8
P120	891.5	119.1	11.8
P174	914.5	89.5	8.9
MMI_{E10} + T_{P6}			
P10	998.1	-	-
P14	925.5	6.0	0.6
P17	1060.7	5.7	0.5
P20	1038.9	14.7	1.4
P25	933.0	30.7	3.2
P30	1090.4	34.1	3.0
P40	1023.3	83.7	7.6
P55	903.9	75.8	7.7
P100	1076.1	76.3	6.6
P130	959.5	117.2	10.9
P180	734.9	106.9	12.7

Los datos son valores absolutos (n=1). Datos de Berbel et al. (1994). Ax.: axón. Amiel.: amielínico. Miel.: mielínico.

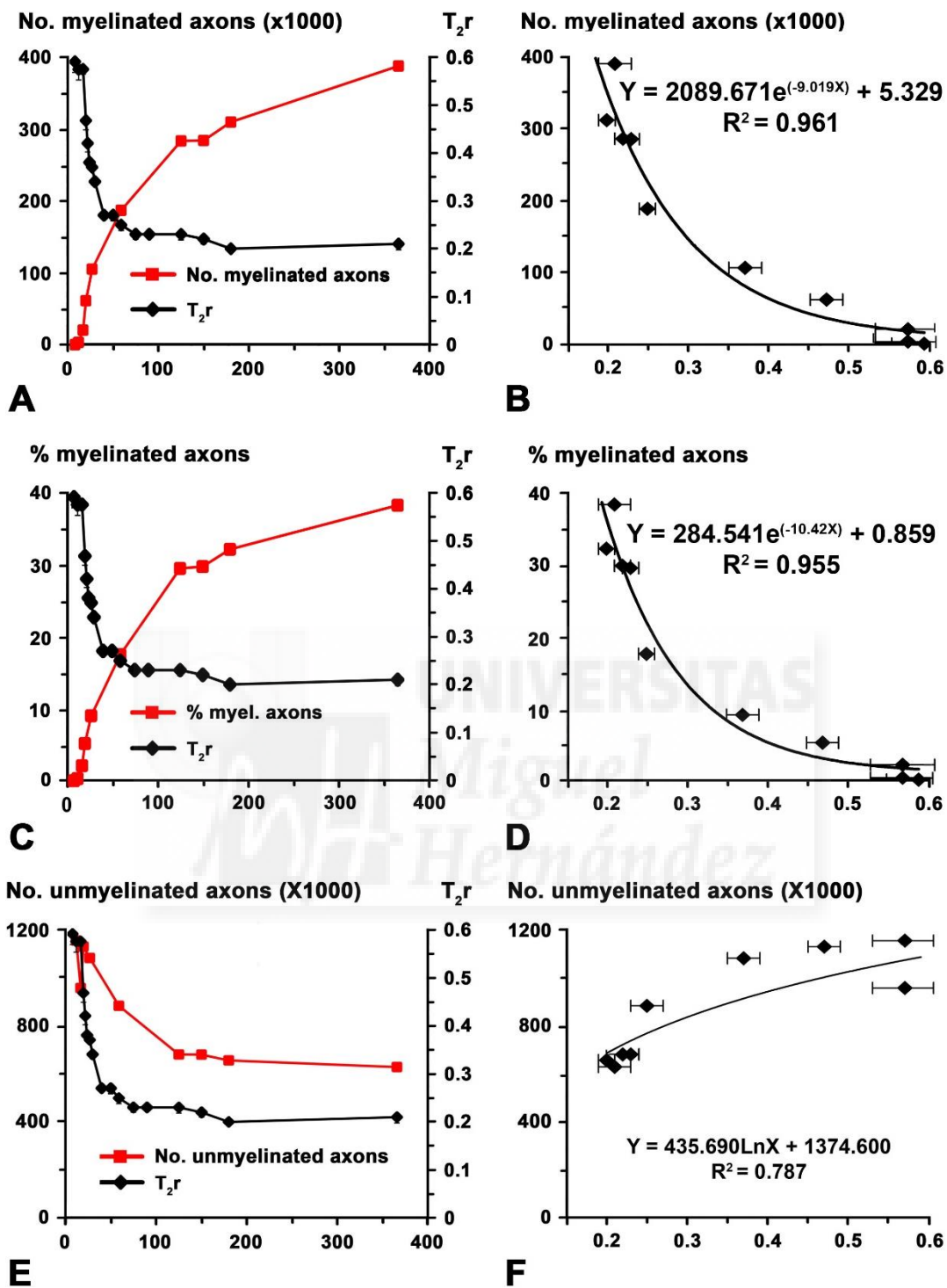


Figura 7. Correlación entre los valores de T_{2r} y datos publicados con ME de la CA. A,C,E. Gráficas mostrando el número y porcentaje de axones mielínicos y el número de axones amielínicos en las ratas C (líneas rojas; los datos de ME que se muestran en A, C y E están publicados en Berbel et al., 1994) y los T_{2r} (líneas negras). **B,D,F.** Funciones de regresión entre estos parámetros. Se ha encontrado altas correlaciones entre los T_{2r} y el número (**B**; $R^2 = 0,961$) y porcentaje (**D**; $R^2 = 0,955$) de axones mielínicos, mientras que el número de axones amielínicos presento una baja correlación con los T_{2r} (**F**; $R^2 = 0,787$).

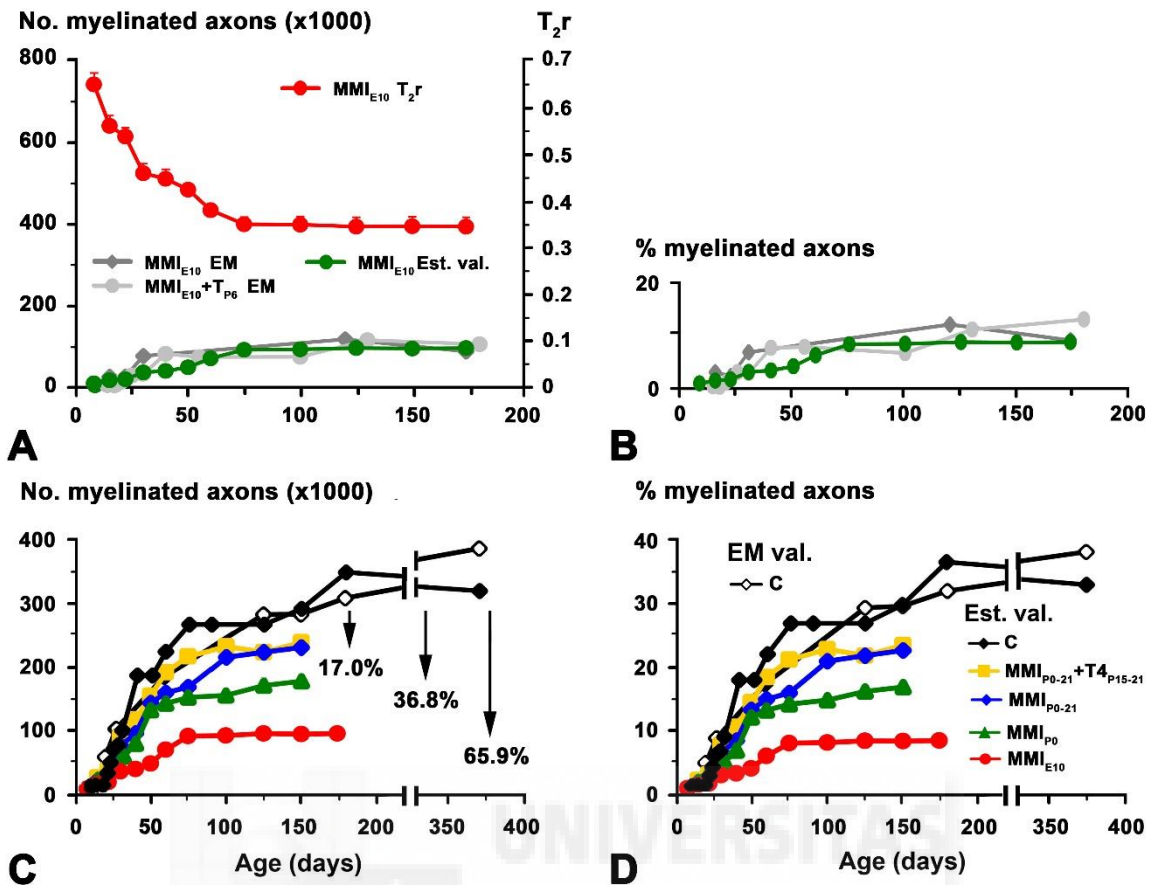


Figura 8. Valores estimados para las ratas tratadas con MMI. A,B. Valores estimados (verde) del número (A) y porcentaje (B) de axones mielínicos para las ratas MMI_{E10} obtenidos mediante el uso de las funciones de regresión mostradas en las figuras 7B,D. Estos valores han sido similares a los obtenidos con ME (datos publicados por Berbel et al., 1994) en las ratas MMI_{E10} (gris) Y $MMI_{E10}+T_{P6}$ rats (gris oscura). Estas funciones de regresión también se usaron para estimar el número y porcentaje de axones mielínicos a edades posnatales en las ratas C, hipotiroideas transitorias y crónicas, como se muestra en C,D. A P150, el número y porcentaje de axones estimados (Est. val) en las ratas C ha sido similar a los valores publicados (EM val.; Berbel et al., 1994). C. El número de axones mielínicos estimados disminuye en las ratas hipotiroideas transitorias (en promedio, 17%), en las MMI_{P0} (38,8%) y MMI_{E10} (65.9%) respecto a las C. D. Se ha encontrado una disminución similar en el porcentaje de axones mielínicos.

4.4 Estudio con ME de la CA a P150

Para verificar los datos estimados, hemos cuantificado el número y porcentaje de axones mielínicos en microfotografías de ME de las ratas C y MMI de este estudio a P150 (4 por grupo; 1 por camada). Además, el análisis cuantitativo se ha completado con el diámetro de los axones mielínicos y amielínicos, el ancho de la vaina de mielina, el cociente g y la velocidad y retraso de la conducción.

Las características ultraestructurales de la r-ant y post de la CA han sido similares a aquellas previamente descritas (Guadaño-Ferráz et al., 1994; Figura 9), siendo destacable, el aumento en la densidad de axones mielínicos en la r-ant respecto a la r-post en cada grupo (comparar Figuras 9C,G,K,O,S con las figuras 9D,H,L,P,T, respectivamente) y además, la densidad de axones mielínicos está disminuida en la r-ant de las ratas hipotiroideas crónicas, comparada con los otros grupos (comparar figuras 9O,S con 9C,G,K).

El área transversal media de la CA de las ratas C ha sido de $201.428 \pm 18.914 \mu\text{m}^2$ y ha disminuido significativamente hasta $175.863 \pm 18.863 \mu\text{m}^2$ en las ratas hipotiroideas transitorias ($P < 0.05$), y en las crónicas hasta $124.781 \pm 14.088 \mu\text{m}^2$ ($P < 0,001$), lo que representa una reducción del 13,5 y 38,4% respecto a las ratas C. El porcentaje del área ocupada por la r-ant en las ratas C y las MMI ha sido, en promedio, el 72,3% del total del área de la CA (contornos de la columna izquierda en la figura 9).

De acuerdo con datos previos, el número total de axones en la CA ha sido similar entre las ratas C y las MMI a P150, con valores que han ido desde el 1.009.160 en las $\text{MMI}_{\text{P}0}$ hasta el 1.114.058 de axones en las ratas $\text{MMI}_{\text{E}10}$ (1.088.607 en las ratas C). Además, el número total de axones amielínicos en la CA aumenta, aunque no significativamente, en las ratas $\text{MMI}_{\text{E}10}$ respecto a las C (Figura 10A; Tabla 4). Sin embargo, el número y porcentaje de axones mielínicos disminuye significativamente en las ratas hipotiroideas transitorias ($P < 0,05$) y crónicas ($P < 0,001$), lo que resulta en una disminución del 16.9 % y 55.2 %, respectivamente respecto a las ratas C (Figura 10; Tabla 4). En todos los grupos experimentales, el número de axones mielínicos ha sido superior en la r-ant que en la r-post (72,3 % en las C, 73,2 % en las ratas hipotiroideas transitorias y 82,5 % en las crónicas; Figuras 10E,F; Tabla 4). Encontrándose diferencias similares en el porcentaje de axones mielínicos (10H,I; Tabla 4).

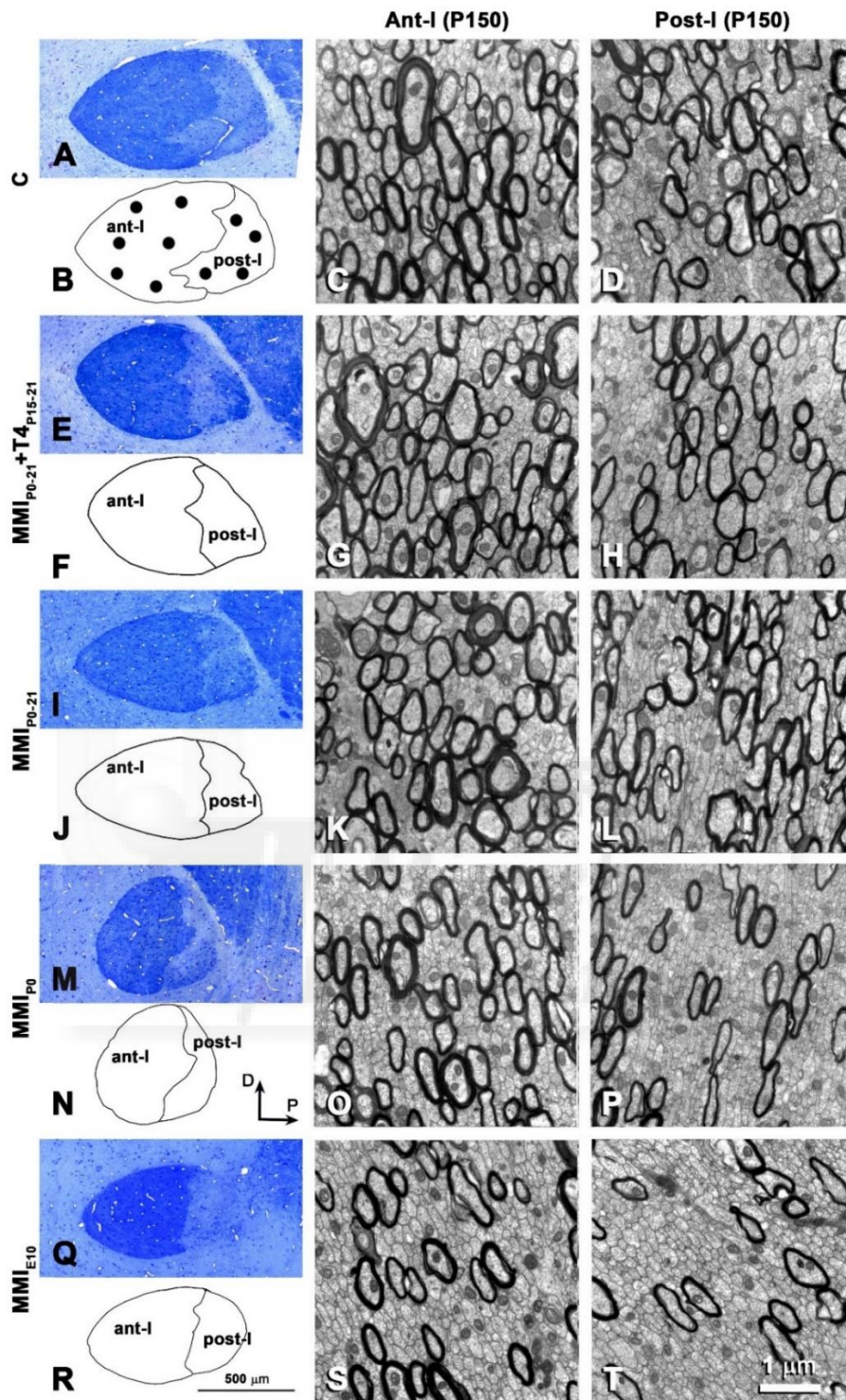


Figura 9. MO y ME de la estructura de la CA a P150. A,E,I,M,Q. Cortes semifinos mostrando la CA. Los límites de la CA con el neuropilo y cada una de sus ramas se muestran en sus contornos correspondientes (B,F,J,N,R). Nótese el descenso en el área transversal medio-sagital de la CA en las ratas MMI comparadas con las C. **Columnas central y derecha.** Imágenes de ME mostrando la ultraestructura de la r-ant y post. Nótese la menor densidad de axones mielínicos en la r-post comparada con la r-ant. En todos los grupos, el ancho de la mielina ha sido similar. Los puntos en B muestran la posición aproximada en donde se tomaron las fotomicrografías de ME. Misma escala para las imágenes de MO (barra en R) y para las micrografías de ME (barra en T).

Tabla 4. Número y porcentaje de axones a P150.

	C	MMI _{P0-21} + T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
r-ant					
No. ax. amiel. (x10 ³)	462,2 ± 86,4	468,6 ± 71,9	438,1 ± 80,6	509,9 ± 56,3	576,5 ± 34,5
No. ax. miel. (x10 ³)	208,8 ± 42,1	176,7 ± 34,7	174,3 ± 32,5	110,0 ± 25,0	104,6 ± 18,6
% ax. miel.	31,1 ± 4,7	26,5 ± 4,6	26,9 ± 3,2	17,7 ± 3,0	15,4 ± 2,3
r-post					
No. ax. amiel. (x10 ³)	337,6 ± 69,9	350,6 ± 48,0	347,4 ± 54,9	363,9 ± 38,6	414,6 ± 52,6
No. ax. miel. (x10 ³)	80,0 ± 12,1	64,5 ± 15,9	63,9 ± 21,2	25,4 ± 10,4	18,5 ± 5,5
% ax. miel.	19,2 ± 5,4	16,0 ± 3,5	16,0 ± 4,4	6,5 ± 2,8	4,3 ± 2,5
CA					
No. ax. amiel. (x10 ³)	799,8 ± 98,7	819,3 ± 85,2	785,6 ± 73,5	873,8 ± 81,9	991,1 ± 62,2
No. ax. miel. (x10 ³)	288,8 ± 72,3	241,2 ± 62,8	238,2 ± 60,9	135,4 ± 46,5	123,1 ± 44,5
% ax. miel.	26,5 ± 8,2	22,9 ± 6,7	23,4 ± 6,7	13,4 ± 5,6	11,1 ± 5,4

Los datos representan la media ± DS. Cuatro ratas por grupo. Ax: axón. Amiel.: amielínico. Miel.: mielínico.



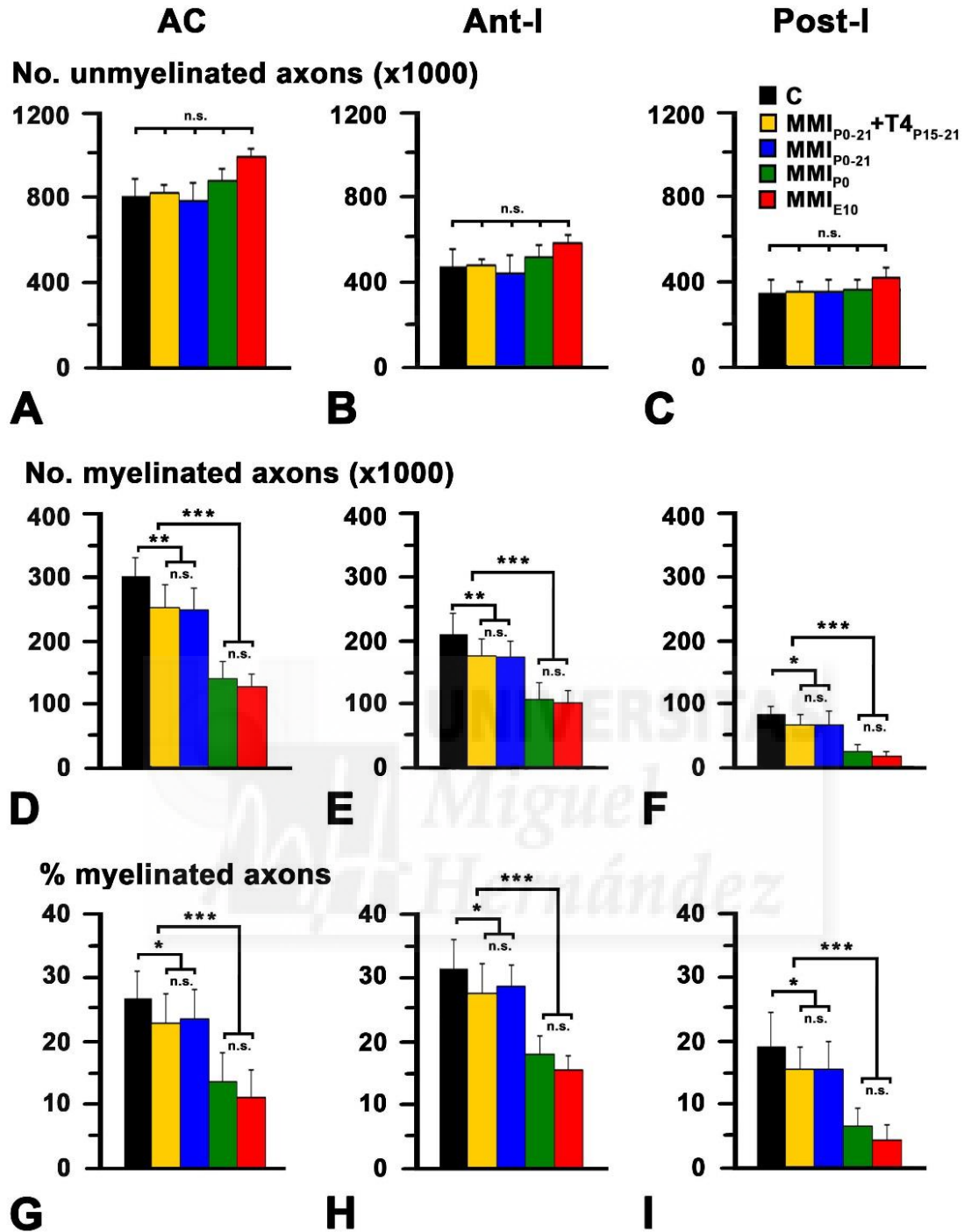


Figura 10. Datos cuantitativos de ME de la CA a P150. Los histogramas de barras muestran el número de axones amielínicos (A-C), y el número (D-F) y porcentaje (G-I) de axones mielínicos encontrados en la CA, la r-ant y r-post. No se han encontrado diferencias significativas en el total de axones amielínicos de las ratas MMI y las ratas C en la CA, la r-ant y la r-post. (A-C). Sin embargo, el número (D-F) y porcentaje (G-I) de axones mielínicos en la CA, r-ant y r-post ha sido significativamente inferior en las ratas tratadas con MMI. Las barras representan la media \pm DS. n.s.; diferencias no significativas. Diferencias significativas: * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ and *** $P \leq 0,001$ ($n = 4$ ratas por grupo).

De forma interesante, el número y porcentaje de axones mielínicos obtenidos a P150 con ME han sido similares a los valores estimados con las funciones de regresión de las ratas C. En la CA, se han calculado 288,765 frente a 292.645 estimados en las ratas C, 239.707 frente a 234,880 estimados en las ratas hipotiroideas transitorias y 129.231 frente a 133.427 en las hipotiroideas crónicas (Figura 11A), lo que resulta en un 26,9 frente a un 29,6 % de axones mielínicos estimados en las ratas C, en un 23,2 frente a un 23,0 % en las hipotiroideas transitorias y un 12,4 frente a un 12,3 en las hipotiroideas crónicas (Figura 11B).

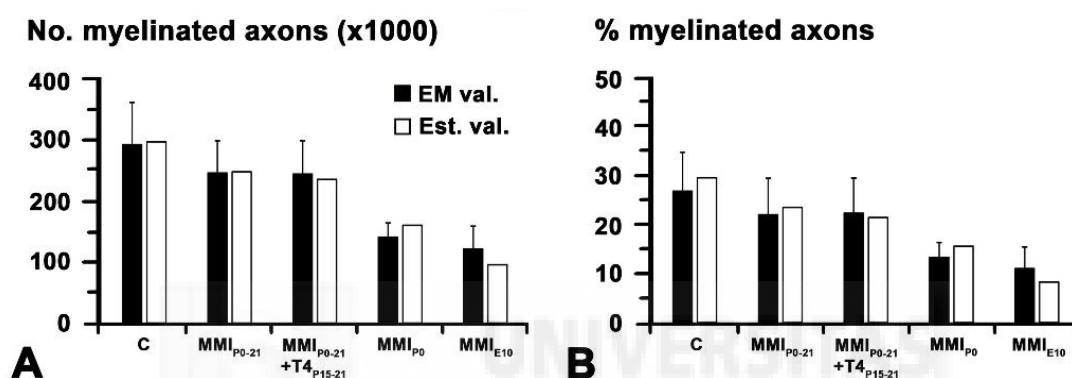


Figura 11. Comparación entre los valores estimados a partir de los T_{2r} y los valores observados con ME. Los histogramas de barras muestran los valores experimentales obtenidos con ME (barras negras) y los estimados a partir de los T_{2r} (barras blancas) para los parámetros número (A) y porcentaje (B) de axones mielínicos. Nótese que los valores observados y estimados son similares. Las barras negras representan la media \pm DS.

En la CA, no se han encontrado diferencias significativas en el diámetro interno de los axones amielínicos y mielínicos (en promedio, $0,21 \pm 0,07$ y $0,52 \pm 0,19$ μm , respectivamente) entre las crías C y las MMI (Tabla 5). En la r-ant, el diámetro de axones amielínicos es similar entre grupos (en promedio, $0,21 \pm 0,06$), mientras que el diámetro de los axones mielínicos disminuye ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas ($0,52 \pm 0,17$ μm frente a $0,55 \pm 0,22$ μm en las ratas hipotiroideas transitorias y C; Figuras 12A,D,G,J,M; Tabla 5). En la r-post, tanto el diámetro de los axones amielínicos como el de los mielínicos (en promedio, $0,21 \pm 0,07$ y $0,51 \pm 0,18$ μm , respectivamente) han sido similares entre las ratas C y las tratadas con MMI (Figuras 13A,D,G,J,M; Tabla 5). En la r-ant y la r-post, el porcentaje de axones mielínicos superiores a 1,0 μm ha sido del 3,5, 1,6 y 0,9 % en las ratas C, hipotiroideas transitorias y crónicas, respectivamente (Figuras 12A,D,G,J,M y Figuras 13A,D,G,J,M).

Tabla 5. Diámetro de axones (μm), ancho de mielina (μm), cociente g y velocidad de conducción (m/s) a P150.

	C	MMI _{P0-21} + T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
CA					
Diam. ax. amiel. (media)	0,20 \pm 0,06 (0,20)	0,21 \pm 0,07 (0,21)	0,23 \pm 0,07 (0,23)	0,20 \pm 0,07 (0,19)	0,21 \pm 0,07 (0,20)
Diam. int. ax. miel. (media)	0,53 \pm 0,21 (0,49)	0,54 \pm 0,21 (0,50)	0,53 \pm 0,21 (0,51)	0,52 \pm 0,17 (0,50)	0,51 \pm 0,17 (0,49)
Ancho mielina (media)	0,083 \pm 0,033 (0,073)	0,083 \pm 0,031 (0,074)	0,081 \pm 0,026 (0,073)	0,089 \pm 0,028 (0,084)	0,090 \pm 0,025 (0,085)
Cociente g (media)	0,75 \pm 0,08 (0,76)	0,75 \pm 0,08 (0,76)	0,76 \pm 0,07 (0,76)	0,74 \pm 0,06 (0,74)	0,73 \pm 0,07 (0,73)
Velocidad conducción (media)	3,80 \pm 1,38 (3,51)	3,87 \pm 1,32 (3,62)	3,83 \pm 1,29 (3,66)	3,84 \pm 1,12 (3,74)	3,84 \pm 1,04 (3,61)
r-ant					
Diam. ax. amiel. (media)	0,20 \pm 0,06 (0,19)	0,22 \pm 0,06 (0,22)	0,23 \pm 0,07 (0,23)	0,20 \pm 0,05 (0,19)	0,22 \pm 0,06 (0,22)
Diam. int. ax. miel. (media)	0,55 \pm 0,23 (0,50)	0,55 \pm 0,22 (0,51)	0,55 \pm 0,22 (0,51)	0,52 \pm 0,18 (0,49)	0,51 \pm 0,17 (0,49)
Ancho mielina (media)	0,090 \pm 0,039 (0,078)	0,089 \pm 0,034 (0,078)	0,088 \pm 0,031 (0,078)	0,093 \pm 0,028 (0,085)	0,094 \pm 0,094 (0,092)
Cociente g (media)	0,75 \pm 0,07 (0,75)	0,75 \pm 0,07 (0,75)	0,75 \pm 0,07 (0,76)	0,73 \pm 0,06 (0,73)	0,72 \pm 0,07 (0,72)
Velocidad conducción (media)	3,99 \pm 1,51 (3,67)	3,98 \pm 1,41 (3,73)	3,98 \pm 1,41 (3,74)	3,90 \pm 1,15 (3,74)	3,85 \pm 1,08 (3,65)
r-post					
Diam. ax. amiel. (media)	0,20 \pm 0,06 (0,20)	0,21 \pm 0,08 (0,21)	0,22 \pm 0,07 (0,23)	0,21 \pm 0,08 (0,22)	0,20 \pm 0,07 (0,20)
Diam. int. ax. miel. (media)	0,49 \pm 0,19 (0,46)	0,52 \pm 0,20 (0,49)	0,52 \pm 0,19 (0,50)	0,52 \pm 0,14 (0,52)	0,51 \pm 0,16 (0,50)
Ancho mielina (media)	0,073 \pm 0,019 (0,069)	0,073 \pm 0,019 (0,070)	0,072 \pm 0,016 (0,070)	0,076 \pm 0,022 (0,070)	0,079 \pm 0,016 (0,079)
Cociente g (media)	0,75 \pm 0,08 (0,77)	0,77 \pm 0,07 (0,78)	0,77 \pm 0,07 (0,78)	0,77 \pm 0,06 (0,77)	0,75 \pm 0,07 (0,75)
Velocidad conducción (media)	3,51 \pm 1,09 (3,34)	3,67 \pm 1,14 (3,47)	3,64 \pm 1,08 (3,61)	3,66 \pm 1,00 (3,73)	3,70 \pm 0,91 (3,60)

Los datos son la media \pm DS. Cuatro ratas por grupo. Ax.: axón. Diam.: diámetro. Miel.: mielínico. Amiel.: amielínico. Int.: interno.

Ant-I (P150)

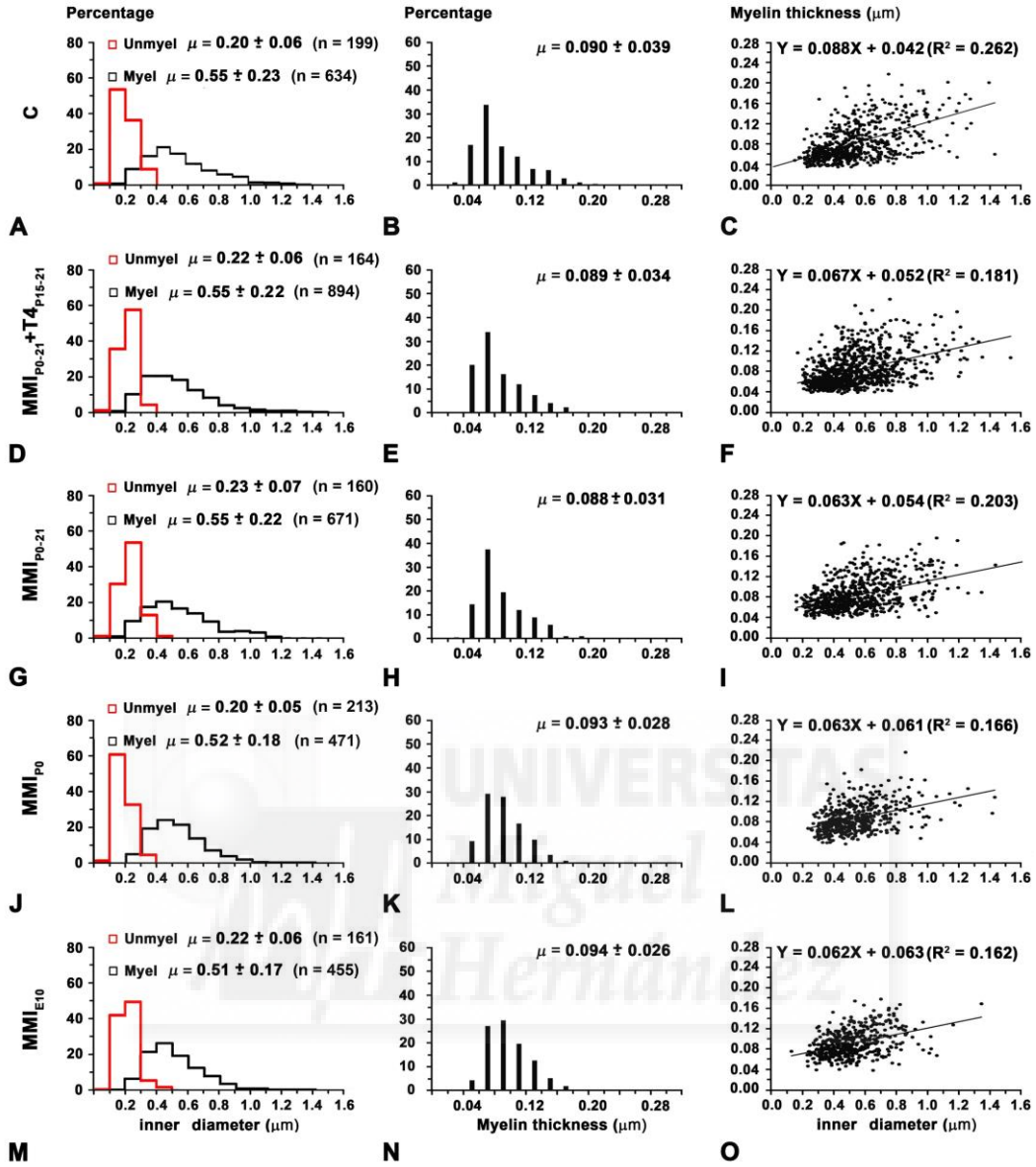


Figura 12. Distribución del diámetro de axones mielínicos y el ancho de la vaina de mielina en la r-ant a P150. A,D,G,J,M. Histogramas mostrando la distribución del diámetro de axones amielínicos y mielínicos en la r-ant. La media de los amielínicos ha sido similar entre las ratas C y las MMI, mientras que el diámetro de los axones mielínicos disminuye ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas. **B,E,H,K,N.** Histogramas mostrando la distribución de frecuencias del ancho de mielina. El valor medio del ancho de mielina es mayor ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas (en promedio, $0,094 \pm 0,027 \mu\text{m}$) respecto a las hipotiroideas transitorias y C (en promedio, $0,089 \pm 0,035 \mu\text{m}$). **C,F,I,L,O.** Diagramas de dispersión mostrando la correlación entre el diámetro interno del axón y el ancho de mielina. Nótese la baja correlación encontrada. Sin embargo, las pendientes de las funciones de regresión han sido mayores en las ratas C (5.0 deg) que en las tratadas con MMI (en promedio, $3,6 \pm 0,1 \text{ deg}$). Se indica el coeficiente de correlación (R^2), el número de axones estudiados (n) y las medias ($\mu = \text{media} \pm \text{DS}$).

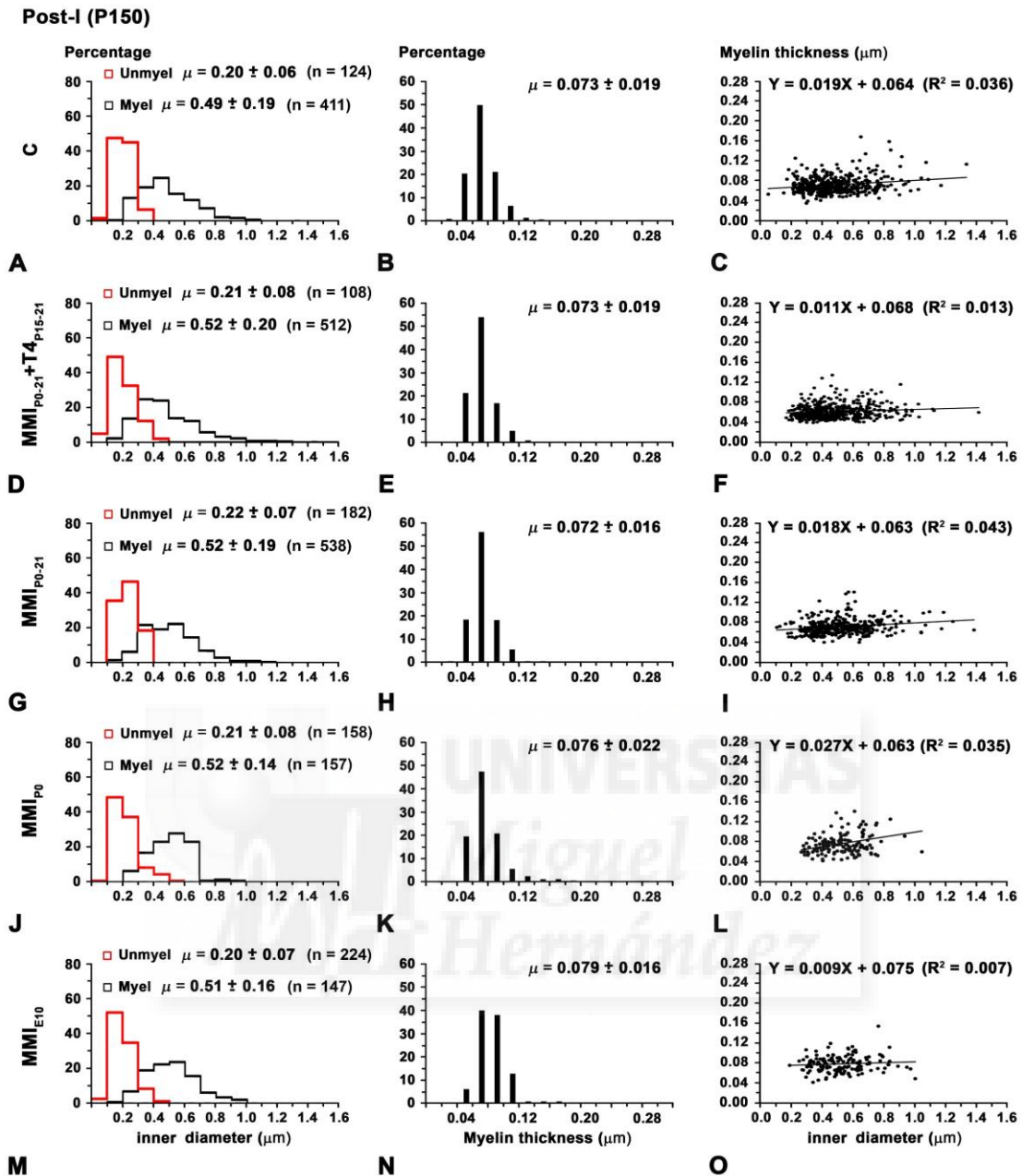


Figura 13. Distribución del diámetro de axones mielínicos y el ancho de la vaina de mielina en la r-post a P150. A,D,G,J,M. Histogramas mostrando la distribución del diámetro de axones amielínicos y mielínicos en la r-post. El diámetro de los axones amielínicos (en promedio, $0,21 \pm 0,07 \mu\text{m}$) y mielínicos (en promedio, $0,51 \pm 0,18 \mu\text{m}$) ha sido similar entre las ratas C y las MMI. **B,E,H,K,N.** Histogramas mostrando la distribución de frecuencias del ancho de mielina. El valor medio del ancho de mielina es mayor ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas (en promedio, $0,078 \pm 0,018 \mu\text{m}$) respecto a las hipotiroideas transitorias y C (en promedio, $0,072 \pm 0,018 \mu\text{m}$). **C,F,I,L,O.** Diagramas de dispersión mostrando la correlación entre el diámetro interno del axón y el ancho de mielina. Nótese la baja correlación encontrada. En todos los grupos, las pendientes de las funciones de regresión han sido muy bajas (en promedio, $0,9 \pm 0,4$ deg). Se indica el coeficiente de correlación (R^2), el número de axones estudiados (n) y las medias ($\mu = \text{media} \pm \text{DS}$).

En la CA, y en la r-ant, el ancho de la vaina de mielina es mayor ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas (en promedio, $0,086 \pm 0,027$ y $0,094 \pm 0,027 \mu\text{m}$, respectivamente, frente a $0,083 \pm 0,030$ y $0,089 \pm 0,035 \mu\text{m}$ en los otros grupos; Figuras 12B,E,H,K,N y Tabla 5). En la r-post, el ancho de la vaina de mielina también ha sido mayor ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas (en promedio, $0,078 \pm 0,018$ frente a $0,073 \pm 0,018 \mu\text{m}$ en los otros grupos; Figuras 13B,E,H,K,N y Tabla 5). El mayor ancho de mielina relativo encontrado en las ratas hipotiroideas crónicas sugiere un retraso en la maduración de los axones. En la r-ant y la r-post, no se ha encontrado una correlación significativa entre el ancho de mielina y el diámetro interno del axón. Sin embargo, la pendiente de la función de correlación ha sido mayor en la r-ant (en promedio, $3,9 \pm 0,6 \text{ deg}$) que en la r-post (en promedio, $0,9 \pm 0,4 \text{ deg}$; Figuras 12C,F,I,L,O y 13C,F,I,L,O), reflejando un mayor aumento progresivo del ancho de la vaina de mielina conforme aumenta el diámetro del axón, indicando un mayor grado de mielinización de los axones mielínicos de la r-ant, a P150.

En la CA y la r-ant, el cociente g ha sido menor ($P < 0,05$) en las ratas hipotiroideas crónicas (en promedio, $0,73 \pm 0,07$ frente a $0,75 \pm 0,07$ en las ratas C e hipotiroideas transitorias; Figuras 14A,C,E,G,I y Tabla 5). La pendiente de la función de correlación entre el diámetro del axón mielínico y el cociente g ha sido similar entre grupos y mayor en la r-post (en promedio, $16,7$ frente a $11,3 \text{ deg}$ en la r-ant; Figura 14).

4.5 Datos funcionales de la conectividad de la CA a P150

La velocidad de conducción ha sido similar entre las ratas C y las MMI, aunque ha sido menor en la r-post (en promedio, $3,64 \pm 1,04 \text{ m/s}$) que en la CA y en la r-ant (en promedio, $3,94 \pm 1,31 \text{ m/s}$; Tabla 5). En la r-ant, el retraso en la conducción entre el tubérculo olfatorio y la corteza piriforme anterior disminuye en las ratas hipotiroideas transitorias (en promedio, $8,2\%$) e hipotiroideas crónicas (en promedio, $32,5\%$), respecto a las C (Figura 15 y tabla 5). En la r-post, el retraso en la conducción entre las cortezas perirrinal y piriforme posterior y los núcleos amigdalinos también ha disminuido en las ratas hipotiroideas transitorias (en promedio, $9,5\%$) y crónicas (en promedio, $24,2\%$), respecto a las ratas C (Figura 15 y tabla 5).

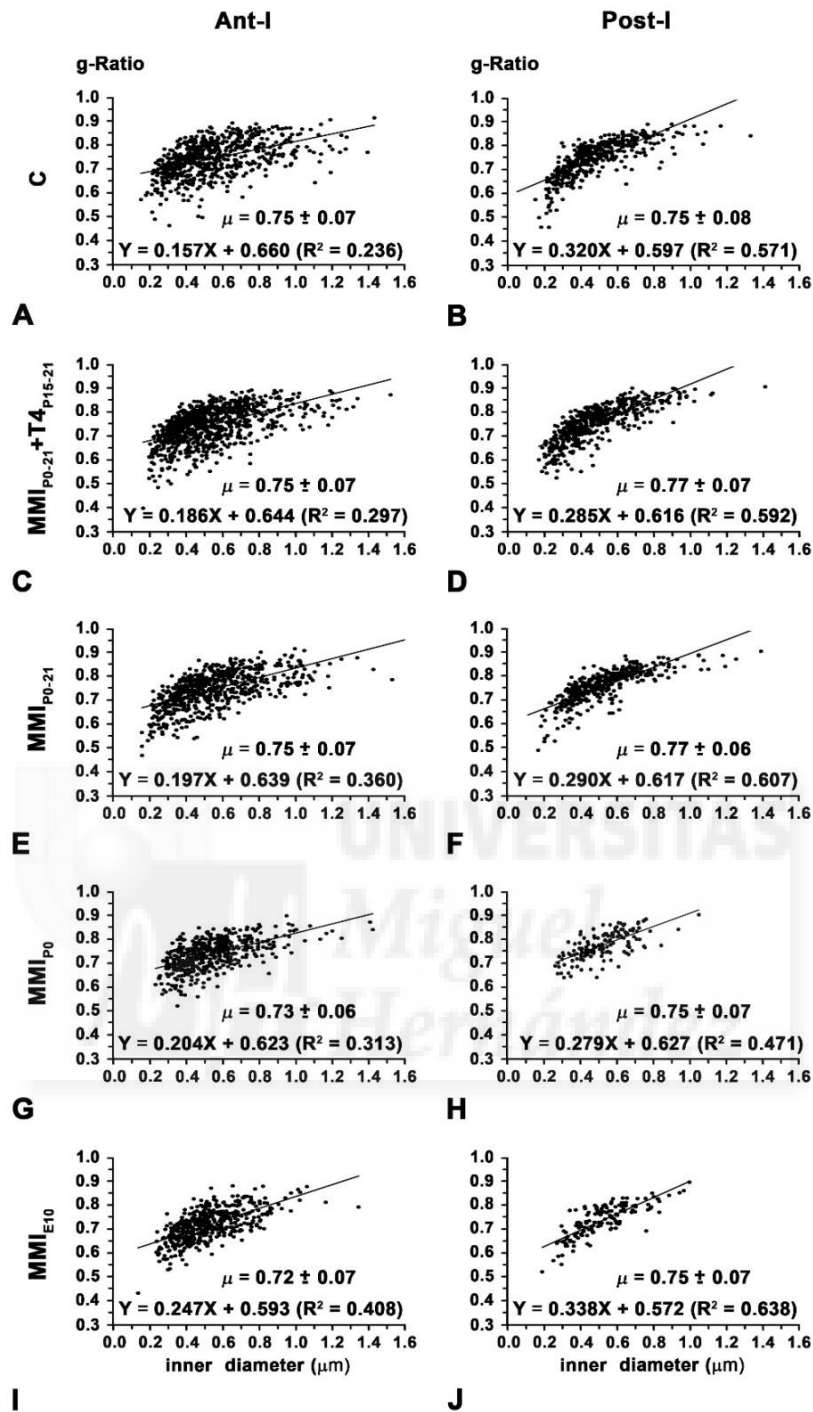


Figura 14. Correlación entre el diámetro del axón y el cociente g en la r-ant y post a P150. Los diagramas de dispersión muestran la correlación entre el diámetro interno del axón y el cociente g en la r-ant (A,C,E,G,I) y en la r-post (B,D,F,H,J) a P150. En la r-ant, el cociente g en las ratas hipotiroideas crónicas (en promedio, $0,73 \pm 0,07$) ha sido menor ($P < 0,05$) que en las hipotiroideas transitorias y en las C (en promedio, $0,75 \pm 0,07$), mientras que en la r-post ha sido similar entre las ratas C y MMI (en promedio, $0,76 \pm 0,08$). Los valores de cociente g han ido desde $0,72 \pm 0,07$ hasta $0,75 \pm 0,07$ en la r-ant, y desde $0,75 \pm 0,08$ hasta $0,77 \pm 0,07$ en la r-post. Tanto en la r-ant como en la r-post, las correlaciones entre el diámetro interno de los axones miélinicos y el cociente g han sido bajas. Se indican las medias del cociente g ($\mu = \text{media} \pm \text{DS}$) y los coeficientes de correlación (R^2).

Tabla 6. Distancia y retraso en la conducción entre las áreas que proyectan a través de la CA a P150.

		C	MMI _{P0-21} + T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
r-ant						
Tuberculo olfatorio	Distancia (mm)	14,6	13,5	13,2	9,8	8,9
	Retraso en la conducción (ms)	3,7 ± 1,4	3,4 ± 1,2	3,3 ± 1,2	2,5 ± 0,7	2,3 ± 0,6
Corteza piriforme anterior	Distancia (mm)	15,3	14,3	13,7	10,4	10,1
	Retraso en la conducción (ms)	3,8 ± 1,5	3,6 ± 1,3	3,4 ± 1,2	2,7 ± 0,8	2,6 ± 0,7
r-post						
Corteza perirrinial	Distancia (mm)	18,2	17,4	17,3	15	14,2
	Retraso en la conducción (ms)	5,2 ± 1,6	4,7 ± 1,5	4,8 ± 1,4	4,1 ± 1,1	3,8 ± 0,9
Corteza piriforme posterior	Distancia (mm)	16,0	14,9	14,9	12,8	12,4
	Retraso en la conducción (ms)	4,6 ± 1,3	4,1 ± 1,1	4,1 ± 1,1	3,5 ± 0,9	3,4 ± 0,8
Núcleo amigdalino lateral	Distancia (mm)	14,6	13,7	13,7	11,8	11,4
	Retraso en la conducción (ms)	4,2 ± 1,4	3,7 ± 1,3	3,8 ± 1,2	3,2 ± 1,0	3,1 ± 0,8

Los datos son la media ± DS. Cuatro ratas por grupo.

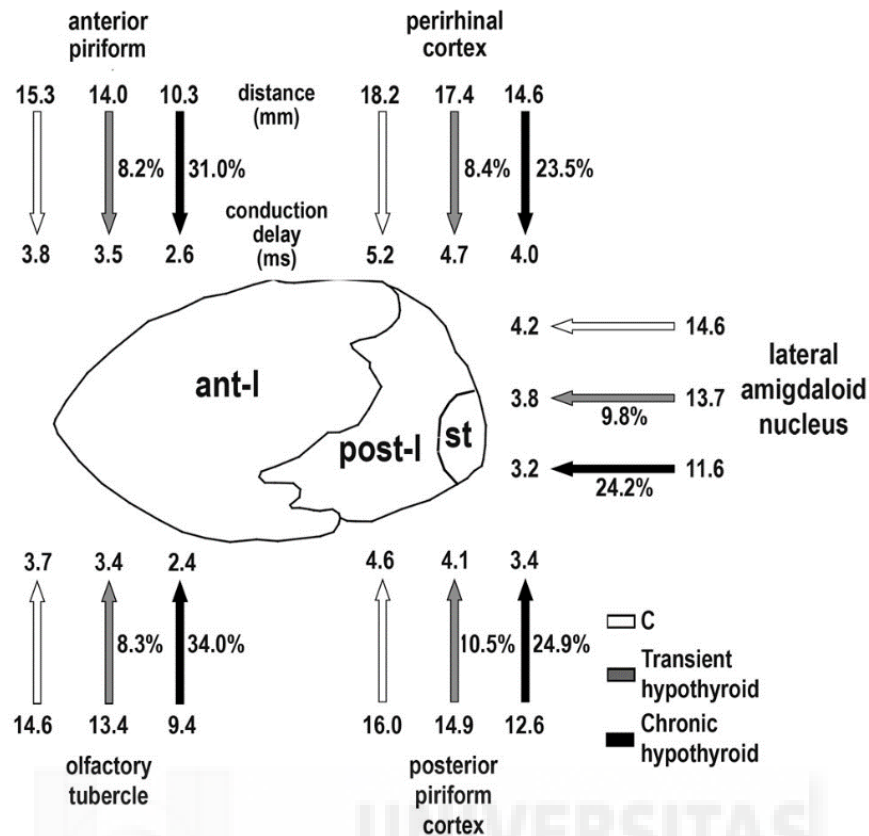


Figura 15. Retraso en la conducción entre áreas conectadas a través de la CA. El dibujo muestra las principales áreas corticales y subcorticales que envían axones a través de la r-ant (tubérculo olfatorio y corteza piriforme anterior) y de la r-post (cortezas perirrinal y piriforme posterior y el núcleo amigdalino lateral). Se indica la distancia media (mm) entre las áreas contralaterales homotópicas (final de la flecha) y los retrasos en la conducción estimados (ms; puntas de flecha) para las ratas C (flechas blancas), hipotiroideas transitorias (flechas grises) y crónicas (flechas negras). En la r-ant, el retraso en la conducción entre áreas contralaterales homotópicas ha sido menor en las ratas hipotiroideas transitorias (en promedio, 8,2%) y crónicas (en promedio, 32,5%) respecto a las ratas C. Mientras que en la r-post, el descenso promedio ha sido de 9,5% en las ratas hipotiroideas transitorias y de 24,2% en las crónicas. Se ha encontrado un descenso similar en la distancia media entre las áreas. st: estria terminalis.





5. DISCUSIÓN



Nuestros datos muestran que el hipotiroidismo crónico y posnatal transitorio altera la maduración de la comisura anterior, la cual no se recupera con tratamiento tardío con T4. Los T_{2r} correlacionan con el número y porcentaje de axones mielínicos presentes en la CA de las ratas C y MMI. Usando las correspondientes funciones de regresión, hemos estimado el número y porcentaje de axones mielínicos en las ratas MMI a P150, estos han resultado similares a los valores de ME y muestran una disminución en el porcentaje y número de axones mielínicos en las ratas MMI respecto a las C a P150. El cociente g ha sido similar entre las ratas C y las MMI, pero el retraso en la conducción disminuyó tanto en la r -ant como en la r -post de las ratas MMI, debido a que sus tractos comisurales son más cortos.

5.1 Consideraciones metodológicas; limitaciones y puntos fuertes

El principal punto fuerte de este trabajo es la combinación de imágenes de la maduración de la CA obtenidas de manera no invasiva e *in vivo* con un estudio cuantitativo *ex vivo* del número de axones amielínicos y mielínicos y sus diámetros mediante microscopía electrónica en la misma rata. Los datos cuantitativos confirman el retraso en la maduración de la CA correlacionada con los T_{2r} .

El estudio se ha limitado a ratas macho, puesto que se han descrito diferencias según el sexo en el área medio sagital de la CA de varios mamíferos, incluidas las ratas (Noonan et al., 1998) y los humanos (Allen y Gorski, 1992). En ratas, la región postero-dorsal de la amígdala medial y la región encapsulada de la estria terminalis son un 97,4 y un 85,2% mayores, respectivamente, en las ratas macho, afectando el número de axones que conectan a través de la r -post y la estria terminalis (Hines et al., 1992). El uso de crías macho evita posibles diferencias basadas en el sexo respecto al área medio sagital de la CA y del número de axones amielínicos y mielínicos.

La obtención y el análisis de las fotografías de ME requiere mucho tiempo y, por lo tanto, el tamaño de la muestra del estudio de ME es relativamente bajo. El número final de ratas por grupo se limitó a cuatro, y los datos obtenidos en las ratas MMI_{E10} y C a P150 han sido similares a nuestros valores estimados y a los valores cuantitativos obtenidos en previos estudios (Gravel et al., 1990; Guadaño-Ferraz et al., 1994; Berbel et al., 1994). Aunque es pequeño, el tamaño muestral puede considerarse como suficiente para evaluar los promedios de las medidas entre la r -ant y r -post y entre los grupos experimentales.

El hecho de que los T_{2r} podrían depender no sólo del grado de mielinización debe ser considerado. Estudios previos dicen que las características histológicas del tejido nervioso, tales como la mielinización y la reducción del espacio extracelular, son factores importantes que afectan al T_{2r} (Chandran et al., 2012; Thiessen et al., 2013; Tsurugizawa et al., 2013; Alonso-Ortiz et al., 2015; Jelescu et al., 2016). En las ratas C, el T_{2r} disminuyó rápidamente desde P8 hasta P50, y a un ritmo más bajo hasta P100, permaneciendo constante después. El T_{2r} se ha

correlacionado con el número y porcentaje de axones mielínicos de las ratas C, lo que también corresponde con un aumento en el número de células gliales y una reducción del espacio extracelular (Gravel et al., 1990; Berbel et al., 1994). En general, estas características celulares son indicadores del grado de maduración de las comisuras de mamíferos. Como se ha dicho con anterioridad, el T_2r se mantiene constante desde P100 en adelante. Sin embargo, el número de axones mielínicos de la CA sigue aumentando después de P100 (Berbel et al., 1994), lo que indica que este aumento es indetectable con los escáneres de IRM actuales. Esto es relevante porque la detección temprana de los primeros signos de algunas enfermedades neurológicas y psiquiátricas, que afectan la mielinización de los axones corticales, podrían no ser detectados con los escáneres de IRM. Este es el caso de los pacientes que padecen leucoencefalopatía tóxica asociada al uso de drogas tales como los opioides y la cocaína (Buttner y Weis, 2006; Alturkustani et al., 2017), donde la desmielinización de los axones de las comisuras y la materia blanca empieza a ser detectable en etapas avanzadas de la enfermedad (Phan-Ba et al., 2012). Lo mismo sucede en monos con la amígdala lesionada, donde las medidas con imágenes del tensor de difusión parecen ser insensibles a cambios en la materia blanca durante las primeras etapas de la recuperación (Grayson et al., 2017). Esto es relevante puesto que la detección temprana por medio de escáneres de IRM T_2p de algunas enfermedades neurológicas y psiquiátricas que afectan la mielinización de los axones corticales y otros factores importantes, podría no ser posible. Se han desarrollado aproximaciones con IRM para estudiar cambios sutiles durante el desarrollo. Las IRM contrastadas con inyecciones con Mn^{2+} (Chan et al., 2012) serán una herramienta útil para estudiar la conectividad de las comisuras. El parámetro kurtosis obtenido en las imágenes de difusión, es muy sensible y específico para detectar cambios en la dirección asociados a cambios ultraestructurales en los procesos de maduración del cerebro (Cheung et al., 2009). Estas aproximaciones aportarán información relevante al estudio de los cambios ultraestructurales en la materia blanca durante el desarrollo y la plasticidad de las conexiones comisurales en ratas normales e hipotiroideas.

5.2 Transferencia de la información alterada en las ratas MMI

La transferencia de información interhemisférica a través de las comisuras telencefálicas dependen de varios factores extrínsecos e intrínsecos, los cuales modulan características del axón tales como la morfología y función. La longitud del axón, el diámetro interno, el ancho de mielina y la distancia internodal están entre los principales factores que determinan la función del axón (Rushton, 1951; Waxman, 1975). De hecho, el diámetro interno y el ancho de mielina están relacionados con la velocidad de conducción del axón, que combinada con la longitud del axón se relaciona con el retraso en la conducción. Estos parámetros están bien establecidos en los axones mielínicos, pero permanecen relativamente desconocidos en los amielínicos. El tamaño del árbol terminal y los botones de los axones

callosos también están relacionados con el diámetro del axón (Innocenti, 2011; Innocenti y Caminiti, 2017).

En la r-ant y r-post, el diámetro interno de los axones amielínicos y mielínicos ha sido similar entre las ratas hipotiroideas transitorias y las ratas C (Tabla 5), mientras que el diámetro interno de los axones mielínicos y el cociente g ha sido menor en la r-ant de las ratas hipotiroideas crónicas con respecto a las ratas hipotiroideas transitorias y C (Tabla 5). La velocidad de conducción de los axones mielínicos ha sido similar en las ratas C y MMI (aunque ha sido menor en la r-post que en la CA y la r-ant). Estos datos sugieren que la transferencia de información entre hemisferios llevada a cabo por los axones amielínicos y mielínicos es similar en las ratas C y MMI. Sin embargo, el número y el porcentaje de axones mielínicos ha disminuido significativamente en las ratas hipotiroideas transitorias (en promedio, 16,9%) y crónicas (en promedio, 55,2%) comparado con las ratas C, reflejando un aumento en el porcentaje de axones amielínicos puesto que el número total de axones ha permanecido similar en las ratas C y MMI (Tabla 4). El aumento en el número y porcentaje de axones amielínicos encontrados en las ratas MMI van a causar una disminución en general de la velocidad de conducción, asumiendo que la velocidad de conducción de los axones amielínicos es menor que los mielínicos, los cuales tienen mayores diámetros internos. El diámetro axonal y la mielinización están asociados, pero la longitud de los axones comisurales dependen de otros factores adicionales. Sin embargo, como las distancias entre las áreas homotópicas conectadas a través de la CA han sido menores en las ratas MMI, el correspondiente retraso en la conducción estimado con los parámetros de los axones mielínicos también ha disminuido. El estudio de las comisuras interhemisféricas proporciona información adicional importante sobre los axones no comisurales (Innocenti, 2017). El descenso en el número de axones mielínicos encontrados en la CA de las ratas hipotiroideas transitorias y crónicas podría también reflejar conexiones anormales ipsilaterales y subcorticales en las áreas conectadas a través de la CA.

No se habían publicado datos referentes al valor promedio del cociente g en la CA de ratas, estos han sido similares a aquellos observados en otras especies, normalmente en el rango de 0,6-0,8 (Chomiak y Hu, 2009; Campbell et al., 2017; Innocenti, 2017). Sin embargo, el porcentaje de axones mielínicos en ratones control a P240 (29,9%) es similar a el encontrado en ratas C a P150 ($31.1 \pm 4.7\%$) y a P365 (38.2%; Berbel et al., 1994). El diámetro de los axones mielínicos $0,53 \pm 0,19 \mu\text{m}$ en ratones C a P240 frente a $0,55 \pm 0,23$ en ratas C a P150) también han sido similares. Aunque Sturrock (1975) no calculó el ancho de mielina, el número medio de vainas de mielina ($7,1 \pm 3,4$) a P240 ha sido similar al encontrado en ratas C a P150 (en promedio, 7,2; datos no publicados), lo que sugiere fuertemente que el ancho de mielina también es similar entre las ratas y los ratones, resultando en un cociente g y una velocidad de conducción similar.

5.3 Comportamiento alterado en las ratas MMI

La CA de las ratas resulta de la fusión de 4 haces de axones. 2 haces se fusionan en la r-ant y contienen axones de los núcleos olfatorios anteriores, la corteza piriforme anterior y el tubérculo olfatorio. Otro haz constituye la r-post y contiene axones de las cortezas piriforme posterior, perirrinal y temporal y del núcleo amigdalóide lateral. El cuarto haz, adyacente a la rama posterior, es la estría terminalis y contiene axones del núcleo olfatorio lateral, basolateral y basomedial y del núcleo cortical de la amígdala (ver esquema y referencias en Guadaño-Ferráz et al., 1994). En primates, las áreas que proyectan a través de las comisuras son más amplias que en roedores, en particular la CA recibe axones de todo el lóbulo temporal, el área 13 de la corteza orbito-frontal, de las subdivisiones frontal y temporal de la corteza pre-piriforme y de los núcleos profundos y corticales de la amígdala (Demeter et al., 1990). En humanos, las áreas de proyección incluyen la parte inferior de los lóbulos temporal y occipital, la convexidad occipital y posiblemente la fisura central y la convexidad prefrontal (Di Virgilio et al., 1999; Patel et al., 2010). En particular, el núcleo amigdalino juega un importante papel en la modulación de las emociones y en los estados asociados a las emociones (Marks, 1987; LeDoux, 2012, 2014). La amígdala recibe estímulos condicionados de las entradas sensoriales y media reacciones de defensa (tales como la parálisis, la actividad del sistema nervioso autónomo y la liberación de hormonas) mediante la modulación de la actividad del núcleo hipotalámico, también gobierna las acciones orientadas a objetivos mediante la modulación de la actividad del estriado ventral (Davis et al., 2010; LeDoux, 2000; 2012). Una emoción alterada puede conducir a diferentes enfermedades mentales y ha sido asociada con enfermedades tales como los trastornos bipolares (LeDoux, 2000; Saxena et al., 2012; Townsend et al., 2013; Janiri et al., 2017) y el TDAH (Humphreys et al., 2016). En ratas, las áreas que proyectan a través de la CA están mayoritariamente involucradas en el olfato, y en el comportamiento de miedo y ansiedad (Amaral, 2003).

Las ratas hipotiroideas crónicas y posnatales tempranas mostraron una mayor preferencia por los brazos abiertos en el test del laberinto elevado en cruz (Navarro et al., 2015). El tiempo empleado en los brazos abiertos fue del 81,1% en las ratas $MMI_{E10-P40}$ y del 57% en las MMI_{P0-P40} , comparadas con el 17,1% de las ratas C, y de forma similar, el número de transiciones a lo largo de los brazos fue significativamente inferior en las ratas tratadas con MMI (de media 4,2 frente a 12,3 en controles). Debido a que las ratas hipotiroideas se caen con frecuencia del aparato, se argumentó que este comportamiento podría estar asociado a una percepción sensorial deteriorada. Nuestros datos muestran que las conexiones comisurales entre áreas amigdalalinas están alteradas en las ratas hipotiroideas transitorias y crónicas, lo que podría causar una disminución de la ansiedad y una percepción alterada de los entornos hostiles. Por lo tanto, el comportamiento anormal de las ratas hipotiroideas crónicas en el test del

laberinto elevado en cruz puede ser debido no sólo a una percepción deteriorada, sino también a una alteración de la ansiedad y de la percepción de los entornos hostiles. La maduración alterada de la CA puede resultar en un aumento de las decisiones impulsivas (Bari y Robbins, 2013), que suelen variar en el cambio de la adolescencia a la edad adulta (Hunt et al., 2016). De acuerdo con esto, se han descrito genes regulados por T3 a nivel de la transcripción, involucrados en la transición de juvenil a adulto (Chatonnet et al., 2015). Por lo tanto, la percepción reducida de los entornos hostiles en las ratas MMI sugiere un comportamiento prolongado de tipo juvenil en el que puede estar involucrado un retraso en la maduración de la CA.

5.4 Implicaciones en enfermedades neurológicas y psiquiátricas de humanos

En roedores, se han encontrado varios cientos de genes, regulados por T3 a nivel de la transcripción, involucrados en eventos básicos del neurodesarrollo (Morte et al., 2010, Chatonnet et al., 2015; Gil-Ibañez et al., 2014, 2017), y alguno de estos genes también se han encontrado mutados en humanos que sufren enfermedades neurológicas y mentales (Berbel et al., 2014). Aunque la maduración posnatal de la corteza cerebral es comparativamente más larga en humanos que en ratas (Marín-Padilla, 1978), se pueden establecer semejanzas porque la mayoría de estos genes regulados por T3, que afectan el establecimiento de las conexiones neuronales, están involucrados en vías conservadas evolutivamente (Morte et al., 2010; Berbel et al., 2014; Chatonnet et al., 2015).

Las ratas hipotiroideas durante el periodo posnatal han sido utilizadas para imitar el hipotiroidismo congénito en humanos (Balázs, 1969; Morreale de Escobar et al., 1983). Además, en ratas hipotiroideas durante el periodo posnatal, se han encontrado genes sub-expresados involucrados en la adhesión de neuronas a glía, afectando su mielinización (Rodríguez-Peña et al., 1993, Rodríguez-Peña, 1999; Barradas et al., 2001; Sharlin et al., 2008). También se han encontrado en pacientes con esquizofrenia y trastornos bipolares (Tkachev et al., 2003). Entre los genes sub-expresados en la esquizofrenia y los trastornos bipolares se encuentra la proteína básica de la mielina (MBP; Schoonover et al., 2004) y la autotaxina (Fuss et al., 1997; Fox et al., 2003; Haas et al., 2004). La vía de Erk1/2 está involucrada en la maduración, promovida por autotaxina, de los oligodendrocitos (Liu et al., 2011; Lee y Petratos, 2016) y la expresión de Erk1/2 se ha encontrado disminuida en ratas hipotiroideas durante el periodo embrionario (Berbel et al., 2010). Por lo tanto, la disminución en el número y porcentaje de axones mielínicos de las ratas hipotiroideas crónicas y transitorias podría ser consecuencia tanto de un menor crecimiento axonal como de una disminución en la proliferación de los precursores de oligodendrocitos y de su maduración, debido a deficiencia, incluso transitoria, de HT.





6. CONCLUSIONES



Conclusiones

- 1. Con IRM se observa un retraso en el desarrollo de la CA en ratas con hipotiroidismo crónico (gestacional y posnatal) y transitorio (posnatal). Un retraso de 15 días en el tratamiento con T4 en ratas con hipotiroidismo transitorio durante la lactancia no revierte los daños causados.**
- 2. Durante el desarrollo de la CA, hay una alta correlación entre el T₂r y el número y porcentaje de axones mielínicos en ratas con hipotiroidismo crónico. Se puede estimar el número y porcentaje de axones mielínicos en la CA de ratas con distintos grados de hipotiroidismo posnatal, usando las funciones de regresión calculadas a partir de los valores de T₂r.**
- 3. A P150 días, los datos obtenidos con MO (área transversal) y con ME (número y diámetro de axones, grosor de la mielina y cociente g) muestran un claro retraso en la maduración de los axones comisurales, en concordancia con los datos de IRM.**
- 4. La velocidad de conducción de los axones mielínicos comisurales ha sido similar entre las ratas C y MMI. Sin embargo, la longitud de los tractos comisurales es menor, y como consecuencia, los retrasos en la conducción han sido inferiores en las ratas MMI.**
- 5. Los datos cuantitativos y funcionales obtenidos a P150 muestran que la conectividad entre las áreas conectadas a través de la CA en las ratas MMI está alterada. Un hipotiroidismo transitorio durante la lactancia causa un retraso en el desarrollo de la CA que no puede ser revertido con un tratamiento tardío con T4.**





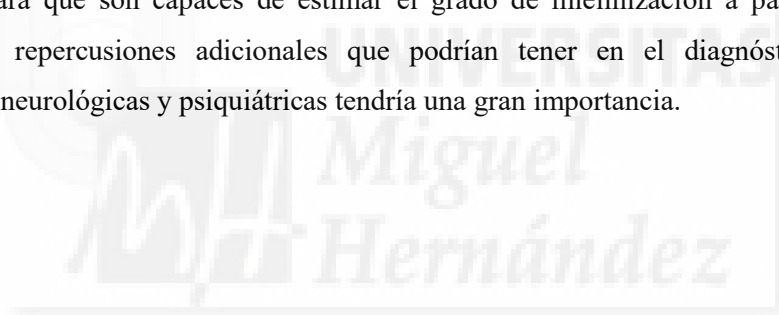
7. DESARROLLO FUTURO DE LA TESIS



Este trabajo ha respondido los objetivos planteados, sin embargo, como todo trabajo de investigación, abre nuevas preguntas, cuyas respuestas deben responderse en futuros proyectos de investigación.

Resultaría interesante estudiar *in vivo* el efecto de las hormonas tiroideas en el desarrollo la CA mediante imágenes de IRM basadas en los tensores de difusión. En particular, se podría estudiar los parámetros de anisotropía fraccional y de kurtosis. Estos valores son muy sensibles a cambios en la dirección de los tractos que forman la CA. Además, se podrían obtener representaciones en tres dimensiones de los tractos, mediante el uso de tractografías, obteniendo datos de las áreas de proyección y del trazado de los tractos. Todos estos datos están asociados a cambios estructurales relacionados con la maduración de la CA.

Otra línea de investigación relevante, sería el estudio de otras comisuras telecefálicas de la rata como el cuerpo calloso. Conocer, si el retraso observado en la CA, ocurre en igual medida en el cuerpo calloso, obteniéndose ecuaciones de regresión parecidas, permitiría poder avanzar en el entendimiento de los factores que determinan el proceso de maduración de las comisuras telencefálicas en la rata y en la de otros mamíferos, incluidos los humanos. De hecho, si se demostrara que son capaces de estimar el grado de mielinización a partir de IRM de humanos, las repercusiones adicionales que podrían tener en el diagnóstico precoz de enfermedades neurológicas y psiquiátricas tendría una gran importancia.







8. BIBLIOGRAFÍA



- Abe T., Suzuki T., Unno M., Tokui T, and Ito S. Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends Endocrinol Metab* (2002) 13:215-220.
- Akasha M, Anderson RR. Thyroxine and triiodothyronine in milk of cows, goats, sheep, and guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* (1984) 177:360-371.
- Allan W, Herndon C. N. & Dudley F. L. Some examples of the inheritance of mental deficiency: apparently sex-linked iodicy and microcephaly. *Am J Ment Defic* (1944) 48:325–334.
- Albert BB, Cutfield WS, Webster D, Carll J, Derraik JG, Jefferies C, Gunn AJ, Hofman PL. Etiology of increasing incidence of congenital hypothyroidism in New Zealand from 1993-2010. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:3155-3160. doi: 10.1210/jc.2012-1562.
- Allen LS, Gorski RA. Sexual orientation and the size of the anterior commissure in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:7199–7202.
- Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, Grobman WA, Laurberg P, Lazarus JH, Mandel SJ, Peeters RP, Sullivan S. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid* (2017) 27:315-389.
- Alonso-Ortiz E, Levesque IR, Pike GB. MRI-based myelin water imaging: A technical review. *Magn Reson Med* (2015) 73:70-81. doi: 10.1002/mrm.25198.
- Alturkustani M, Ang LC, Ramsay D. Pathology of toxic leucoencephalopathy in drug abuse supports hypoxic-ischemic pathophysiology/etiology. *Neuropathology* (2017) 37:321-328. doi: 10.1111/neup.12377.
- Amaral DG. The amygdala, social behavior, and danger detection. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 1000:337-347.
- Andersson M, de Benoist B, Delange F, and Zupan J. Prevention and control of iodine deficiency in pregnant and lactating women and in children less than 2-years-old: conclusions and recommendations of the Technical Consultation. *Public Health Nutr* (2007) 10:1606-1611.
- Angevine J. B. Jr, and Sidman R. LAutoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* (1961) 192:766-768.
- Aycan Z, Cangul H, Muzza M, Bas VN, Fugazzola L, Chatterjee VK, et al. Digenic DUOX1 and DUOX2 mutations in cases with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* (2017) 102:3085-3090. doi: 10.1210/jc.2017-00529.
- Azizi F, Aminorroya A, Hedayati M, Rezvanian H, Amini M, and Mirmiran P. Urinary iodine excretion in pregnant women residing in areas with adequate iodine intake. *Public Health Nutr* (2003) 6:95-98.
- Azizi F, Smyth P. Breastfeeding and maternal and infant iodine nutrition. *Clin Endocrinol* (2009) 70:803-809. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03442.x.
- Bazrafshan HR, Mohammadian S, Ordoorkhani A, Abedini A, Davoudy R, Pearce EN, Hedayati M, Azizi F, Braverman LE. An assessment of urinary and breast milk iodine concentrations in lactating mothers from Gorgan, Iran. *Thyroid* (2003) 15:1165-1178.
- Balázs, R., Brooksbank, B.W., Davison, A.N., Eayrs, J.T., Wilson, D.A. The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res* (1969) 15:219–232.

- Bari A, Robbins TW. Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. *Prog Neurobiol* (2013) 108:44-79. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.06.005.
- Barradas PC, Vieira RS, De Freitas MS. Selective effect of hypothyroidism on expression of myelin markers during development. *J Neurosci Res* (2001) 66:254-261.
- Barkovich AJ. Techniques and methods in pediatric magnetic resonance imaging. *Semin Ultrasound CT MR* (1988) 9:186-189.
- Barkovich AJ. Concepts of myelin and myelination in neuroradiology. *AJNR Am J Neuroradiol* (2000) 21:1099-1109.
- Bassett, C.B. Harvey, G.R. Williams, Mechanisms of thyroid hormone receptor specific nuclear and extra nuclear actions, *Mol Cell Endocrinol* (2003) 213:1-11.
- Bauman ML, Kemper TL. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci* (2005) 23:183-187.
- Bayer S. A, and Altman J. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience* (1991) 45:391-412.
- Becker DV, Braverman LE, Delange F, Dunn JT, Franklyn JA, Hollowell JG, Lamm SH, Mitchell ML, Pearce E, Robbins J, Rovet JF. Iodine supplementation for pregnancy and lactation-United States and Canada: recommendations of the American Thyroid Association. *Thyroid* (2006) 16:949-951.
- Bellani M, Baiano M, Brambilla P. Brain anatomy of major depression II. Focus on amygdala. *Epidemiol Psychiatr Sci* (2011) 20:33-36.
- Bellani M, Calderoni S, Muratori F, Brambilla P. Brain anatomy of autism spectrum disorders II. Focus on amygdala. *Epidemiol Psychiatr Sci* (2013) 22:309-312. doi: 10.1017/S2045796013000346.
- Berbel P, Innocenti GM. The development of the corpus callosum in cats: a light- and electronmicroscopic study. *J Comp Neurol* (1988) 276:132-156.
- Berbel P, Guadaño-Ferraz A, Angulo A, Ramón Cerezo J. Role of thyroid hormones in the maturation of interhemispheric connections in rats. *Behav Brain Res* (1994) 20:9-14.
- Berbel, P., Marco, P., Cerezo, J.R. and DeFelipe, J., Distribution of parvalbumin immunoreactivity in the neocortex of hypothyroid rats. *Neurosci. Lett* (1996) 204:65-68.
- Berbel P, Obregón MJ, Bernal J, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Iodine supplementation during pregnancy: a public health challenge. *Trends Endocrinol Metab* (2007) 18:338-343. Epub 2007 Oct 24.
- Berbel P, Navarro D, Ausó E, Varea E, Rodríguez AE, Ballesta JJ, et al. Role of late maternal thyroid hormones in cerebral cortex development: an experimental model for human prematurity. *Cereb Cortex* (2010) 20:1462-1475.
- Berbel P, Morreale de Escobar G. "Iodine and brain development". In: Preedy VR, Watson RR, Martin CR, editors. *International Handbook of Behavior Food and Nutrition*. New York: Springer (2011). p. 2105-34.

- Berbel P, Navarro D, Román GC. An evo-devo approach to thyroid hormones and cerebral cortex development: etiological implications for autism. *Front Endocrinol* (2014) 5:146. doi: 10.3389/fendo.2014.00146.
- Bernal J. Action of thyroid hormone in brain. *J Endocrinol Invest* (2002) 25:268-288.
- Bernal J. Thyroid hormones and brain development. *Vitam Horm* (2005) 71:95-122.
- Bernal J. (2011). Thyroid hormone resistance syndromes. *Endocrinol Nutr* 58:185-196.
- Bianco A. C, Salvatore D, Gereben B, Berry M. J, and Larsen P. R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases *Endocr Rev* (2002) 23:38-89.
- Bianco A. C, and Larsen P. R. Cellular and structural biology of the deiodinases. *Thyroid* (2005) 15:777-786.
- Bianco A. C, and Kim B. W. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* (2006) 116:2571-2579.
- Bizhanova A, and Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology* (2009) 150:1084-1090.
- Bora E. Neurodevelopmental origin of cognitive impairment in schizophrenia. *Psychol Med* (2015a) 45:1-9. doi: 10.1017/S0033291714001263.
- Bora E. Developmental trajectory of cognitive impairment in bipolar disorder: comparison with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* (2015b) 25:158-168. doi: 10.1016/j.euroneuro.2014.09.007.
- Brambilla P, Bellani M, Yeh PH, Soares JC, Tansella M. White matter connectivity in bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry* (2009) 21:380-386. doi: 10.1080/09540260902962172.
- Brody BA, Kinney HC, Kloman AS, Gilles FH. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. I. An autopsy study of myelination. *J Neuropathol Exp Neurol* (1987) 46:283-301.
- Brokken LJ, Bakker O, Wiersinga WM, Prummel MF. Functional thyrotropin receptor expression in the pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (2005) 113:13-20.
- Brown-Grant K. The iodide concentrating mechanism of the mammary gland. *J Physiol* (1957) 11:644-654.
- Buttner A, Weis S. Neuropathological alterations in drug abusers: The involvement of neurons, glial, and vascular systems. *Forensic Sci Med Pathol* (2006) 2:115-126.
- Calvo R, Obregon M. J, Ruiz de Ona C, Escobar del Rey F, and Morreale de Escobar G. Congenital hypothyroidism, as studied in rats. Crucial role of maternal thyroxine but not of 3,5,3'triiodothyronine in the protection of the fetal brain. *J Clin Invest* (1990) 86:889-899.
- Campbell JSW, Leppert IR, Narayanan S, Boudreau M, Duval T, Cohen-Adad J, et al. Promise and pitfalls of g-ratio estimation with MRI. *Neuroimage* (2017) S1053-8119:30685-7. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.08.038.

- Ceballos A, Belinchon M. M, Sanchez-Mendoza E, Grijota-Martinez C, Dumitrescu A. M, Refetoff S, and Bernal J. Importance of monocarboxylate transporter 8 for the bloodbrain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* (2009) 150:2491-2496.
- Chan KC, Wu EX. In vivo manganese-enhanced MRI for visuotopic brain mapping. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* (2012) 2012:2279-2282. doi: 10.1109/EMBC.2012.6346417.
- Chandran P, Upadhyay J, Markosyan S, Lisowski A, Buck W, Chin CL, et al. Magnetic resonance imaging and histological evidence for the blockade of cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuroscience* (2012) 202:446-453. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.051.
- Chatonnet F, Flamant F, Morte B. A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. *Biochim Biophys Acta* (2015) 1849:122-129. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.023.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* (2010) 31:139-170. doi: 10.1210/er.2009-0007.
- Cheung MM, Hui ES, Chan KC, Helpert JA, Qi L, Wu EX. Does diffusion kurtosis imaging lead to better neural tissue characterization? A rodent brain maturation study. *Neuroimage* (2009) 45:386-392. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.12.018.
- Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* (2009) 150:1091-1096. doi: 10.1210/en.2008-1795.
- Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* (2009) 4:e7754. doi: 10.1371/journal.pone.0007754.
- Clairman H, Skocic J, Lischinsky JE, Rovet J. Do children with congenital hypothyroidism exhibit abnormal cortical morphology? *Pediatr Res* (2015) 78:286-297. doi: 10.1038/pr.2015.93.
- Cohen K, Ellis M, Khoury S, Davis P, Hercbergs A, Ashur-Fabian O. Thyroid Hormone Is a MAPK-Dependent Growth Factor for Human Myeloma Cells Acting via $\alpha\beta3$ Integrin. *Molecular Cancer Research* (2011) 9:1385-1394.
- Costa-e-Sousa RH, Hollenberg AN. Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* (2012) 153:4128-4135. doi: 10.1210/en.2012-1467.
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* (2010) 35:105-135. doi: 10.1038/npp.2009.109.
- De Carlos J. A, Lopez-Mascaraque L, and Valverde F. Dynamics of cell migration from the lateral ganglionic eminence in the rat. *J Neurosci* (1996) 16:6146-6156.
- Deladoëy J, Ruel J, Giguère Y, Van Vliet G. Is the incidence of congenital hypothyroidism really increasing? A 20-year retrospective population-based study in Québec. *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96:2422-2429. doi: 10.1210/jc.2011-1073.
- De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* (2000) 80:1083-1105.

- Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW. Fields of origin and pathways of the interhemispheric commissures in the temporal lobe of macaques. *J Comp Neurol* (1990) 302:29-53.
- Di Virgilio G, Clarke S, Pizzolato G, Schaffner T. Cortical regions contributing to the anterior commissure in man. *Exp Brain Res* (1999) 124:1-7.
- Dunn J.T, and Dunn, A.D. In: Braverman LE, Utiger R, editors. *The thyroid* 8th ed. Philadelphia: lippincott williams and wilkins, (2000) 91-104.
- Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* (2004) 74:168-175.
- Dumont J, Opitz R, Christophe D, Vassart G, Roger P.P, Maenhaut C. *Ontogeny, Anatomy, Metabolism and Physiology of the Thyroid.* (ed. DeGroot, L. J.).
- Dussault JH, Ruel J. Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol* (1987) 49:321-34.
- 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.
- Flamant F, Gauthier K, and Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* (2007) 21:321-333.
- Forrest D, Vennström B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid* (2000) 10:41-52.
- Fox MA, Colello RJ, Macklin WB, Fuss B. Phosphodiesterase-I α /autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci* (2003) 23:507-519.
- Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* (2003) 278:40128-40135.
- Friesema E. C, Jansen J, Milici C, and Visser T. J. Thyroid hormone transporters. *Vitam Horm* (2005) 70:137-167.
- Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB. Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci* (1997) 17:9095-9103.
- Galton VA, Schneider MJ, Clark AS, St Germain DL. Life without thyroxine to 3,5,3'triiodothyronine conversion: studies in mice devoid of the 5'-deiodinases. *Endocrinology* (2009) 150:2957-2963. doi: 10.1210/en.2008-1572.
- García M, Fernández A, Moreno JC. Central hypothyroidism in children. *Endocr Dev* (2014) 26:79107. doi: 10.1159/000363157.
- Gao B, and Meier P. J. Organic anion transport across the choroid plexus. *Microsc Res Tech* (2001) 52:60-64.

Gil-Ibáñez P, Bernal J, Morte B. Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells: role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic acid and glucocorticoids. *PLoS One* (2014) 9:e91692. doi: 10.1371/journal.pone.0091692.

Gil-Ibáñez P, García-García F, Dopazo J, Bernal J, Morte B. Global Transcriptome Analysis of Primary Cerebrocortical Cells: Identification of Genes Regulated by Triiodothyronine in Specific Cell Types. *Cereb Cortex* (2017) 27:706-717. doi: 10.1093/cercor/bhv273.

Gil-Ibáñez P, Belinchón MM, Morte B, Obregón MJ, Bernal J. Is the Intrinsic Genomic Activity of Thyroxine Relevant In Vivo? Effects on Gene Expression in Primary Cerebrocortical and Neuroblastoma Cells. *Thyroid* (2017) 27:1092-1098. doi: 10.1089/thy.2017.0024.

Glinoe D. The regulation of thyroid function during normal pregnancy: importance of the iodine nutrition status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2004) 18:133-152.

Glinoe D. The importance of iodine nutrition during pregnancy. *Public Health Nutr* (2007) 10:1542-1546.

Gnidehou S, Caillou B, Talbot M, Ohayon R, Kaniewski J, Noël-Hudson MS, Morand S, Agnangji D, Sezan A, Courtin F, Virion A, Dupuy C. Iodotyrosine dehalogenase 1 (DEHAL1) is a transmembrane protein involved in the recycling of iodide close to the thyroglobulin iodination site. *FASEB J* (2004) 18:1574-1586.

Goodman J, Marsh R, Peterson BS, Packard MG, Child J. Annual research review: The neurobehavioral development of multiple memory systems-implications for childhood and adolescent psychiatric disorders. *Psychol Psychiatry* (2014) 55:582-610.

Gravel C, Sasseville R, Hawkes R. Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. *J Comp Neurol* (1990) 291:147-161.

Grayson D, Bliss-Moreau E, Bennett J, Lavenex P, Amaral D. Neural Reorganization Due to Neonatal Amygdala Lesions in the Rhesus Monkey: Changes in Morphology and Network Structure. *Cereb Cortex* (2017) 27:3240-3253.

Green SA, Goff B, Gee DG, Gabard-Durnam L, Flannery J, Telzer EH, Humphreys KL, Louie J, Tottenham N. Discrimination of amygdala response predicts future separation anxiety in youth with early deprivation. *J Child Psychol Psychiatry* (2016) 57:1135-44. doi: 10.1111/jcpp.12578.

Guadaño Ferraz A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Innocenti GM, Berbel P. The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats. *Brain Res Dev Brain Res* (1994) 81:293-308.

Guo S, Kendrick K, Zhang J, Broome M, Yu R, Liu Z. Brain-wide functional inter-hemispheric disconnection is a potential biomarker for schizophrenia and distinguishes it from depression. *NeuroImage: Clinical* (2013) 2:818-826.

Haas MJ, Mreyoud A, Fishman M, Mooradian AD. Microarray analysis of thyroid hormone-induced changes in mRNA expression in the adult rat brain. *Neurosci Lett* (2004) 365:14-28.

Hennig J, Friedburg H. Clinical applications and methodological developments of the RARE technique. *Magnetic Resonance Imaging* (1988) 6:391-405.

Heyerdahl S, Oerbeck B. Congenital hypothyroidism: developmental outcome in relation to levothyroxine treatment variables. *Thyroid* (2003) 13:1029-1038.

- Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* (1992) 579:321–326.
- Hollowell J. G, and Haddow J. E. The prevalence of iodine deficiency in women of reproductive age in the United States of America. *Public Health Nutr* (2007) 10:1532-1539.
- Huang SA, Fish SA, Dorfman DM, Salvatore D, Kozakewich HP, Mandel SJ, Larsen PR. A 21-year-old woman with consumptive hypothyroidism due to a vascular tumor expressing type 3 iodothyronine deiodinase. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87:4457-4461.
- Humphreys KL, Tottenham N, Lee SS. Risky decision-making in children with and without ADHD: A prospective study. *Child Neuropsychol* (2016) 24:261-76. doi: 10.1080/09297049.2016.1264578.
- Hunt PS, Burk JA, Barnet RC. Adolescent transitions in reflexive and non-reflexive behavior: Review of fear conditioning and impulse control in rodent models. *Neurosci Biobehav Rev* (2016) 70:33-45. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.026.
- Hynd GW, Hall J, Novey ES, Eliopoulos D, Black K, Gonzalez JJ, Edmonds JE, Riccio C, Cohen M. Dyslexia and corpus callosum morphology. *Arch Neurol* (1995) 52:32-38.
- Innocenti GM, Berbel P. Analysis of an experimental cortical network: I). Architectonics of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid; similarities with human microgyria. *J Neural Transplant Plast* (1991) 2:1-28.
- Innocenti GM. Exuberant development of connections, and its possible permissive role in cortical evolution. *Trends Neurosci* (1995) 18:397-402.
- Innocenti GM, Ansermet F, Parnas J. Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum. *Mol Psychiatry* (2003) 8:261-274.
- Innocenti GM, Price DJ. Exuberance in the development of cortical networks. *Nat Rev Neurosci* (2005) 6:955-965.
- Innocenti GM. Development and evolution: two determinants of cortical connectivity. *Prog Brain Res* (2011) 189:65-75. doi: 10.1016/B978-0-444-53884-0.00018-X.
- Innocenti GM, Vercelli A, Caminiti R. The diameter of cortical axons depends both on the area of origin and target. *Cereb Cortex* (2014) 24:2178-2188. doi: 10.1093/cercor/bht070.
- Innocenti GM, Caminiti R. Axon diameter relates to synaptic bouton size: structural properties define computationally different types of cortical connections in primates. *Brain Struct Funct* (2017) 222:1169-1177. doi: 10.1007/s00429-016-1266-1.
- Innocenti GM. Network causality, axonal computations, and Poffenberger. *Exp Brain Res* (2017) 235:2349-2357. doi: 10.1007/s00221-017-4948-x.
- Ishido Y, Luo Y, Yoshihara A, Hayashi M, Yoshida A, Hisatome I, Suzuki K. Follicular thyroglobulin enhances gene expression necessary for thyroid hormone secretion. *Endocr J* (2015) 62:1007-1015. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0263.
- Janiri D, Sani G, Rossi P, Piras F, Iorio M, Banaj N, et al. Amygdala and hippocampus volumes are differently affected by childhood trauma in patients with bipolar disorders and healthy controls. *Bipolar Disord* (2017) 19:353-362. doi: 10.1111/bdi.12516.

- Jelescu IO, Zurek M, Winters KV, Veraart J, Rajaratnam A, Kim NS, et al. In vivo quantification of demyelination and recovery using compartment-specific diffusion MRI metrics validated by electron microscopy. *Neuroimage* (2016) 132:104-114. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.02.004.
- Jimenez D, Lopez-Mascaraque L. M, Valverde F, and De Carlos J. A. Tangential migration in neocortical development. *Dev Biol* (2002) 244:155-169.
- Kinne A, Schülein R, Krause G. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res* (2011). doi: 10.1186/1756-6614-4-S1-S7.
- Kikinis Z, Fitzsimmons J, Dunn C, Vu MA, Makris N, Bouix S, et al. Anterior commissural white matter fiber abnormalities in first-episode psychosis: a tractography study. *Schizophr Res* (2015) 162:29-34. doi: 10.1016/j.schres.2015.01.037.
- Koldovský O, Thornburg W. Hormones in milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (1987) 6:172-196.
- Kostović I, Jovanov-Milosević N. The development of cerebral connections during the first 20-45 weeks' gestation. *Semin Fetal Neonatal Med* (2006) 11:415-422.
- Krude H, Kühnen P, Biebermann H. Treatment of congenital thyroid dysfunction: Achievements and challenges. *Clin Endocrinol Metab* (2015) 29:399-413. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.004.
- Kucharczyk W, Macdonald PM, Stanisz GJ, Henkelman RM. Relaxivity and magnetization transfer of white matter lipids at MR imaging: importance of cerebroside and pH. *Radiology* (1994) 192:521-529.
- LaMantia AS, Rakic P. Axon overproduction and elimination in the anterior commissure of the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol* (1994) 340:328-336.
- LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* (2000) 23:155-184.
- LeDoux JE. Evolution of human emotion: a view through fear. *Prog Brain Res* (2012) 195:431-442. doi: 10.1016/B978-0-444-53860-4.00021-0.
- LeDoux JE. Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111:2871-8. doi: 10.1073/pnas.1400335111.
- Lee JY, Petratos S. Thyroid hormone signaling in oligodendrocytes: from extracellular transport to intracellular signal. *Mol Neurobiol* (2016) 53:6568-83. doi: 10.1007/s12035-016-0013-1.
- Lee S, Leach MK, Redmond SA, Chong SY, Mellon SH, Tuck SJ, Feng ZQ, Corey JM, Chan JR: A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods* (2012) 9:917-922.
- Léger J. Congenital hypothyroidism: a clinical update of long-term outcome in young adults. *Eur J Endocrinol* (2015) 172: R67-77. doi: 10.1530/EJE-14-0777.
- Lewis TL Jr, Courchet J, Polleux F. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation growth and branching. *J Cell Biol* (2013) 202:837-848.
- Lima FR, Gervais A, Colin C, Izembart M, Neto VM, Mallat M. Regulation of microglial development: a novel role for thyroid hormone. *J Neurosci* (2001) 21:2028-2038.

- Lombardi A, Moreno M, de Lange P, Iossa S, Busiello R, Goglia F. Regulation of skeletal muscle mitochondrial activity by thyroid hormones: focus on the “old” triiodothyronine and the “emerging” 3,5-diiodothyronine. *Frontiers in Physiology* (2015) 6:237. doi: 10.3389/fphys.2015.00237.
- Lucio RA, García JV, Ramón Cerezo J, Pacheco P, Innocenti GM, Berbel P. The development of auditory callosal connections in normal and hypothyroid rats. *Cereb Cortex* (1997) 7:303-316.
- Marín-Padilla M. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol* (1978) 152:109-126.
- Marin-Padilla M. Origin, formation, and prenatal maturation of the human cerebral cortex: an overview. *J Craniofac Genet Dev Biol* (1990) 10:137-146.
- Marks I. The development of normal fear: a review. *J Child Psychol Psychiatry* (1987) 28:667-697.
- Marlinge E, Bellivier F, Houenou J. White matter alterations in bipolar disorder: potential for drug discovery and development. *Bipolar Disord* (2014) 16:97-112. doi: 10.1111/bdi.12135.
- Matsumae M, Kurita D, Atsumi H, Haida M, Sato O, Tsugane R. Sequential changes in MR water proton relaxation time detect the process of rat brain myelination during maturation. *Mech Ageing Dev* (2001) 122:1281-1291.
- McIntosh AM, Hall J, Lymer GK, Sussmann JE, Lawrie SM. Genetic risk for white matter abnormalities in bipolar disorder. *Int Rev Psychiatry* (2009) 21:387-393. doi: 10.1080/09540260902962180.
- Mendel CM, Weisiger RA, Jones AL, Cavalieri RR. Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. *Endocrinology* (1987) 120:1742-1749.
- Miller DJ, Duka T, Stimpson CD, Schapiro SJ, Baze WB, McArthur MJ, Fobbs AJ, Sousa AM, Sestan N, Wildman DE, Lipovich L, Kuzawa CW, Hof PR, Sherwood CC. Prolonged myelination in human neocortical evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:16480-16485. doi: 10.1073/pnas.1117943109.
- Moreno JC, Pauws E, van Kampen AH, Jedlicková M, de Vijlder JJ, Ris-Stalpers C. Cloning of tissue-specific genes using serial analysis of gene expression and a novel computational substraction approach. *Genomics* (2001) 75:70-76.
- Moreno JC, Klootwijk W, van Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, Lèger A, Goudie D, Polak M, Grütters A, Visser TJ. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N Engl J Med* (2008) 24:1811-1818.
- Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* (1985) 117:1890-900.
- Morreale de Escobar G, Obregon M. J, and Escobar del Rey F. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia? *J Clin Endocrinol Metab* (2000) 85:3975-3987.
- Morreale de Escobar, G., Obregon, M. J., and Escobar del Rey, F. Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur J Endocrinol* (2004) 151:25-37.

- Morte B, Díez D, Ausó E, Belinchón MM, Gil-Ibáñez P, Grijota-Martínez C, et al. Thyroid hormone regulation of gene expression in the developing rat fetal cerebral cortex: prominent role of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV pathway. *Endocrinology* (2010) 151:810-820. doi: 10.1210/en.2009-0958.
- Mukherjee P, Whalley HC, McKirdy JW, Sprengelmeyer R, Young AW, McIntosh AM, Lawrie SM, Hall J. Altered amygdala connectivity within the social brain in schizophrenia. *Schizophr Bull* (2014) 40:152-160. doi: 10.1093/schbul/sbt086.
- Navarro D, Alvarado M, Navarrete F, Giner M, Obregon MJ, Manzanares J, Berbel P. Gestational and early postnatal hypothyroidism alters VGluT1 and VGAT bouton distribution in the neocortex and hippocampus, and behavior in rats. *Front Neuroanat* (2015) 9:9. doi: 10.3389/fnana.2015.00009.
- Ng L, Goodyear RJ, Woods CA, Schneider MJ, Diamond E, Richardson GP, Kelley MW, Germain DL, Galton VA, Forrest D. Hearing loss and retarded cochlear development in mice lacking type 2 iodothyronine deiodinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:3474-3489.
- Ng L, Hernandez A, He W, Ren T, Srinivas M, Ma M, Galton VA, St Germain DL, Forrest D. A protective role for type 3 deiodinase, a thyroid hormone-inactivating enzyme, in cochlear development and auditory function. *Endocrinology* (2009) 150:1952-1960. doi: 10.1210/en.20081419.
- Ng L, Lyubarsky A, Nikonov SS, Ma M, Srinivas M, Kefas B, St Germain DL, Hernandez A, Pugh EN Jr, Forrest D. Type 3 deiodinase, a thyroid-hormone-inactivating enzyme, controls survival and maturation of cone photoreceptors. *J Neurosci* (2010) 30:3347-3357. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5267-09.2010.
- Noonan M, Smith MA, Kelleher K, Sanfilippo MA. Sex differences in anterior commissure size in the rat. *Brain Res Bull* (1998) 45:101-114.
- Oppenheimer J. H. Role of plasma proteins in the binding, distribution and metabolism of the thyroid hormones. *N Engl J Med* (1968) 278:1153-1162.
- Ohtsuki S, Takizawa T, Takanaga H, Hori S, Hosoya K, and Terasaki T. Localization of organic anion transporting polypeptide 3 (oatp3) in mouse brain parenchymal and capillary endothelial cell. *J Neurochem* (2004) 90:743-749.
- Özerdem A, Ceylan D, Can G. Neurobiology of Risk for Bipolar Disorder. *Curr Treat Options Psychiatry* (2016) 3:315-329.
- Patel MD, Toussaint N, Charles-Edwards GD, Lin JP, Batchelor PG. Distribution and fibre field similarity mapping of the human anterior commissure fibres by diffusion tensor imaging. *MAGMA* (2010) 23:399-408. doi: 10.1007/s10334-010-0201-3.
- Pappa T, Ferrara AM, Refetoff S. Inherited defects of thyroxine-binding proteins. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2015) 29:735-747. doi: 10.1016/j.beem.2015.09.002.
- Peeters RP, Wouters PJ, van Toor H, Kaptein E, Visser TJ, Van den Berghe G. Serum 3,3',5'-triiodothyronine (rT3) and 3,5,3'-triiodothyronine/rT3 are prognostic markers in critically ill patients and are associated with postmortem tissue deiodinase activities. *J Clin Endocrinol Metab* (2005) 90:4559-4565.

- Peeters RP, Hernandez A, Ng L, Ma M, Sharlin DS, Pandey M, Simonds WF, St Germain DL, Forrest D. Cerebellar abnormalities in mice lacking type 3 deiodinase and partial reversal of phenotype by deletion of thyroid hormone receptor $\alpha 1$. *Endocrinology* (2013) 154:550-561. doi: 10.1210/en.20121738.
- Prummel MF, Brokken LJ, Wiersinga WM. Ultra short-loop feedback control of thyrotropin secretion. *Thyroid* (2004) 14:825-829.
- Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* (1972) 145:61-83.
- Refetoff S, Robin N. I, and Fang V. S. Parameters of thyroid function in serum of 16 selected vertebrate species: a study of PBI, serum T4, free T4, and the pattern of T4 and T3 binding to serum proteins. *Endocrinology* (1970) 86:793-805.
- Rillema JA, Hill MA. Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2003) 284:E25-8.
- Roberts L. M, Woodford K, Zhou M, Black D. S, Haggerty J. E, Tate E. H, Zerangue N. Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* (2008) 149:6251-6261.
- Rodríguez-Peña A, Ibarrola N, Iñiguez MA, Muñoz A, Bernal J. Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *J Clin Invest* (1993) 91:812-818.
- Rodríguez-Peña A. Oligodendrocyte development and thyroid hormone. *J Neurobiol* (1999) 40:497-512.
- Rovet JF, Ehrlich RM, Sorbara DL. Neurodevelopment in infants and preschool children with congenital hypothyroidism: etiological and treatment factors affecting outcome. *J Pediatr Psychol* (1992) 17:187-213.
- Rovet JF. Long-term neuropsychological sequelae of early-treated congenital hypothyroidism: effects in adolescence. *Acta Paediatr Suppl* (1999) 88:88-95.
- Rovet JF. Congenital hypothyroidism: an analysis of persisting deficits and associated factors. *Child Neuropsychol* (2002) 8:150-162.
- Rousset B, Dupuy C, Miot F, Dumont J. Chapter 2 Thyroid Hormone Synthesis And Secretion. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-2015.
- Rushton WAH. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* (1951) 115:101– 122.
- Samadi A, Skocic J, Rovet JF. Children born to women treated for hypothyroidism during pregnancy show abnormal corpus callosum development. *Thyroid* (2015) 25:494-502. doi: 10.1089/thy.2014.0548.
- Santos NC, Costa P, Ruano D, Macedo A, Soares MJ, Valente J, Pereira AT, et al. Revisiting thyroid hormones in schizophrenia. *J Thyroid Res* (2012) 2012:569147. doi: 10.1155/2012/569147.

Saxena K, Tamm L, Walley A, Simmons A, Rollins N, Chia J, et al. A preliminary investigation of corpus callosum and anterior commissure aberrations in aggressive youth with bipolar disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* (2012) 22:112-119. doi: 10.1089/cap.2011.0063.

Schoonover CM, Seibel MM, Jolson DM, Stack MJ, Rahman RJ, Jones SA, et al. Thyroid hormone regulates oligodendrocyte accumulation in developing rat brain white matter tracts. *Endocrinology* (2004) 145:5013-5020.

Schumann CM, Hamstra J, Goodlin-Jones BL, Lotspeich LJ, Kwon H, Buonocore MH, et al. The amygdala is enlarged in children but not adolescents with autism; the hippocampus is enlarged at all ages. *J Neurosci* (2004) 24:6392-6401.

Schumann CM, Amaral DG. Stereological analysis of amygdala neuron number in autism. *J Neurosci* (2006) 26:7674-7679.

Schwartz CE, Stevenson RE. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* (2007) 21:307-321.

Sellitti DF, Suzuki K. Intrinsic regulation of thyroid function by thyroglobulin. *Thyroid* (2014) 24:625-638. doi: 10.1089/thy.2013.0344.

Sharlin DS, Tighe D, Gilbert ME, Zoeller RT. The balance between oligodendrocyte and astrocyte production in major white matter tracts is linearly related to serum total thyroxine. *Endocrinology* (2008) 149:2527-2536. doi: 10.1210/en.2007-1431.

Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* (2010) 35:169-191. doi: 10.1038/npp.2009.83.

Song Y, Driessens N, Costa M, De Deken X, Detours V, Corvilain B, Dumon J. E. Roles of hydrogen peroxide in thyroid physiology and disease. *J Clin Endocrinol Metab* (2007) 92:3764-3773.

Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, Azizi F, Mestman J, Negro R, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid* (2011a) 21:1081-1125. doi: 10.1089/thy.2011.0087.

Stagnaro-Green A, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Negro R. High rate of persistent hypothyroidism in a large-scale prospective study of postpartum thyroiditis in southern Italy. *J Clin Endocrinol Metab* (2011b) 96:652-7. doi: 10.1210/jc.2010-1980.

Stikov N, Campbell JS, Stroh T, Lavelée M, Frey S, Novek J, Nuara S, et al. In vivo histology of the myelin g-ratio with magnetic resonance imaging. *Neuroimage* (2015) 118:397-405. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.05.023.

Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* (2010) 20:327-48. doi: 10.1007/s11065-010-9148-4.

Sturrock RR. A quantitative electron microscopic study of myelination in the anterior limb of the anterior commissure of the mouse brain. *J Anat* (1975) 119:67-75.

Sturrock RR. Neurons in the mouse anterior commissure. A light microscopic, electron microscopic and autoradiographic study. *J Anat* (1977) 123:751-62.

Sturrock RR. Age-related changes in the number of myelinated axons and glial cells in the anterior and posterior limbs of the mouse anterior commissure. *J Anat* (1987) 150:111-127.

Suárez R, Gobius I, Richards LJ. Evolution and development of interhemispheric connections in the vertebrate forebrain. *Front Hum Neurosci* (2014) 14;8:497. doi: 10.3389/fnhum.2014.00497.

Sugiyama D, Kusuhara H, Lee Y. J, and Sugiyama Y. Involvement of multidrug resistance associated protein 1 (Mrp1) in the efflux transport of 17beta estradiol-D-17beta-glucuronide (E217betaG) across the blood-brain barrier. *Pharm Res* (2003) 20:1394-1400.

Sun Y, Bak B, Schoenmakers N, van Trotsenburg AS, Oostdijk W, Voshol P, et al., Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an X-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. *Nat Genet* (2012) 44:1375-1381. doi: 10.1038/ng.2453.

Suzuki K, Mori A, Lavaroni S, Ulianich L, Miyagi E, Saito J, Nakazato M, Pietrarelli M, Shafran N, Grassadonia A, Kim WB, Consiglio E, Formisano S, Kohn LD. Thyroglobulin regulates follicular function and heterogeneity by suppressing thyroid-specific gene expression. *Biochimie* (1999) 81:329-340.

Taglieri L, Nardo T, Vicinanza R, Ross J, Scarpa S, Coppotelli G. Thyroid hormone regulates fibronectin expression through the activation of the hypoxia inducible factor 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2017) 493:1304-1310.

Tajima T, Nakamura A, Ishizu K. A novel mutation of IGSF1 in a Japanese patient of congenital central hypothyroidism without macroorchidism. *Endocr J* (2013) 60:245-249.

Thiessen JD, Zhang Y, Zhang H, Wang L, Buist R, Del Bigio MR, et al. Quantitative MRI and ultrastructural examination of the cuprizone mouse model of demyelination. *NMR Biomed* (2013) 26:1562-1581. doi: 10.1002/nbm.2992.

Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* (2003) 362:798-805.

Tokuyama T, Yoshinari M, Rawitch AB, Taurog A. Digestion of thyroglobulin with purified thyroid lysosomes: preferential release of iodoamino acids. *Endocrinology* (1987) 121:714-721.

Tromp DP, Grupe DW, Oathes DJ, McFarlin DR, Hernandez PJ, Kral TR, et al. Reduced structural connectivity of a major frontolimbic pathway in generalized anxiety disorder. *Arch Gen Psychiatry* (2012) 69:925-934. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.2178.

Tsurugizawa T, Ciobanu L, Le Bihan D. Water diffusion in brain cortex closely tracks underlying neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110:11636-11641. doi: 10.1073/pnas.1303178110.

Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, et al. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* (2001) 55:597-610.

Van Tijn DA, de Vijlder JJ, Verbeeten B Jr, Verkerk PH, Vulsma T. Neonatal detection of congenital hypothyroidism of central origin. *J Clin Endocrinol Metab* (2005) 90:3350-3359.

Van Wassenaer AG, Stulp MR, Valianpour F, Tamminga P, Ris Stalpers C, de Randamie JS, van Beusekom C, de Vijlder JJ. The quantity of thyroid hormone in human milk is too low to influence plasma thyroid hormone levels in the very preterm infant. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2002) 56:621-627.

Velasco I, Carreira M, Santiago P, Muela J. A, Garcia-Fuentes E, Sanchez-Munoz B, Soriguer F. Effect of iodine prophylaxis during pregnancy on neurocognitive development of children during the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab* (2009) 94:3234-3241.

Vidali S, Chéret J, Giesen M, Haeger S, Alam M, Watson R, Langton AK, Klinger M, Knuever J, Funk W, Kofler B, Paus R. Thyroid Hormones Enhance Mitochondrial Function in Human Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* (2016) 136:2003-2012.

Vostrikov VM, Uranova NA, Orlovskaya DD. Deficit of perineuronal oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr Res* 2007 94:273-280.

Waxman SG. Integrative properties and design principles of axons. *Int Rev Neurobiol* (1975) 18:140.

Wheeler SM, McLelland VC, Sheard E, McAndrews MP, Rovet JF. Hippocampal Functioning and Verbal Associative Memory in Adolescents with Congenital Hypothyroidism. *Front Endocrinol* (2015) 19:156-163. doi: 10.3389/fendo.2015.00163.

Zimmermann M., and Delange F. Iodine supplementation of pregnant women in Europe: a review and recommendations. *Eur J Clin Nutr* (2004) 58;979-984.

Zimmermann M. *IDD Newsletter* (2007) 23:1-2. (<http://www.iccid.org>).

Zimmermann M. Iodine deficiency uncovered in the UK. *IDD Newsletter* (2011) 39 (3):1-2. (<http://www.iccid.org>).

Zoeller R. T, and Rovet J. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings *J Neuroendocrinol* (2004) 16:809-818.





9. APÉNDICE: PUBLICACIONES



Transient hypothyroidism during lactation arrests myelination in the anterior commissure of rats. A magnetic resonance image and electron microscope study.

Federico S. Lucia¹, Jesús Pacheco-Torres², Susana González-Granero³, Santiago Canals², María-Jesús Obregón⁴, José Manuel García-Verdugo³ and Pere Berbel^{1,*}.

¹) Departamento de Histología y Anatomía, Facultad de Medicina, Universidad Miguel Hernández (UMH), Sant Joan d'Alacant, Alicante, Spain.

²) Instituto de Neurociencias de Alicante, UMH – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Sant Joan d'Alacant, Alicante.

³) Laboratorio de Neurobiología Comparada. Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de Valencia - CIBERNED, Valencia, Spain.

⁴) Instituto de investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, CSIC - Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain.

Correspondence:

Dr. Pere Berbel
Departamento de Histología y Anatomía
Universidad Miguel Hernández
Av. Ramón y Cajal s/n,
Sant Joan d'Alacant, 03550 Alicante, Spain.
pere.berbel@umh.es

Running title:

Neonatal hypothyroidism and anterior commissure development. MRI and EM study.

Keywords: limbic system, thyroid hormones, iodine diet, congenital hypothyroidism, rodent behaviour, psychiatric diseases, bipolar disorders, schizophrenia.

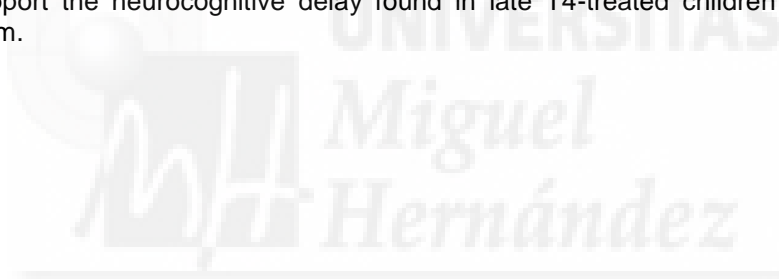
F.S. Lucia, J. Pacheco-Torres, S. Gonzalez, S. Canals, M.J. Obregón, J.M. García-Verdugo and P. Berbel. Transient hypothyroidism during lactation arrest myelination in the anterior commissure of rats. A magnetic resonance image and electron microscope study. *Front Neuroanat* (2018) 12:31. doi: 10.3389/fnana.2018.00031S.

Frontiers of Neuroanatomy metrics:

IF=3.26; ranking 2/22 in Anatomy and Morphology (Q1, 1st decil).

Abstract

Thyroid hormone deficiency at early postnatal ages affects the cytoarchitecture and function of neocortical and telencephalic limbic areas, leading to impaired associative memory and in a wide spectrum of neurological and mental diseases. Neocortical areas project interhemispheric axons mostly through the corpus callosum and to a lesser extent through the anterior commissure (AC), while limbic areas mostly project through the AC and hippocampal commissures. Functional magnetic resonance data from children with late diagnosed congenital hypothyroidism and abnormal verbal memory processing, suggest altered ipsilateral and contralateral telencephalic connections. Gestational hypothyroidism affects AC development but the possible effect of transient and chronic postnatal hypothyroidism, as occurs in late diagnosed neonates with congenital hypothyroidism and in children growing up in iodine deficient areas, still remains unknown. We studied AC development using *in vivo* magnetic resonance imaging and electron microscopy in hypothyroid and control male rats. Four groups of methimazole (MMI) treated rats were studied. One group was MMI-treated from postnatal day (P) 0 to P21; some of these rats were also treated with L-thyroxine (T4) from P15-21, as a model for early transient hypothyroidism. Other rats were MMI-treated from P0-150 and from embryonic day (E) 10 to P170, as a chronic hypothyroidism group. The results were compared with age paired control rats. The normalized T2 signal using magnetic resonance image was higher in MMI-treated rats and correlated with the number and percentage of myelinated axons. Using electron microscopy, we observed decreased myelinated axon number and density in transient and chronic hypothyroid rats at P150, unmyelinated axon number increased slightly in chronic hypothyroid rats. In MMI-treated rats, the myelinated axon g-ratio and conduction velocity was similar to control rats, but with a decrease in conduction delays. These data show that early postnatal transient and chronic hypothyroidism alters AC maturation that may affect the transfer of information through the AC. The alterations cannot be recovered after delayed T4-treatment. Our data support the neurocognitive delay found in late T4-treated children with congenital hypothyroidism.



INTRODUCTION

In humans, agenesis, dysgenesis (including ectopy) and dysfunction of the thyroid gland commonly produces congenital hypothyroidism, causing neurological and psychiatric diseases, such as intellectual disability, spasticity, and disturbances of gait and coordination (Dussault and Ruel, 1987; Rovet et al., 1992; Rovet, 1999; Brown, 2012; Rovet, 2002; Léger, 2015; Krude et al., 2015; Clairman et al., 2015; Aycan et al., 2017).

Screening programs are crucial for the early detection and treatment of congenital hypothyroidism and the prevention of neurological and mental diseases in children that would result from a late diagnosis (O'Callaghan et al., 1995; Kester et al., 2004; Rovet and Simic, 2008; Williams and Hume, 2008; Willoughby et al., 2014). Some neurological deficits may persist even when diagnosis of congenital hypothyroidism is at birth (Rovet, 2002; Huo et al., 2011). Disrupted associative processing in children with early postnatal thyroid hormone insufficiency has been associated with a reduced volume and abnormal function of the hippocampus (Wheeler et al., 2015). The incidence of primary transient congenital hypothyroidism is increasing in some countries, particularly cases with milder thyroid gland dysfunction (Pearce et al., 2010; Léger et al., 2015). The reasons for this remain poorly understood, but may be related to changes in screening thresholds (Olivieri et al., 2013; Léger et al., 2015) and to gestational and early postnatal iodine deficiency (Sava et al., 1984; Köhler et al., 1996; Pearce et al., 2004; Morreale de Escobar and Escobar del Rey, 2003; Berbel and Morreale de Escobar, 2011; Walker et al., 2007; Berbel et al., 2007). In some mild iodine-deficient areas, 3.9% of women developed hypothyroidism associated with postpartum thyroiditis (Stagnaro-Green et al., 2011a), which is typically diagnosed at the sixth month postpartum (Lazarus, 2011; Stagnaro-Green et al., 2011a), that is to say at the end of the nursing period recommended by the WHO and UNICEF (Stagnaro-Green et al., 2011b). Breastfeeding children born to hypothyroid women in iodine-deficient areas, where official prevention programs and monitoring for iodine supplementation during gestation and lactation are not yet implemented, will most probably have their thyroid function compromised.

In the majority of mammals (including humans), critical processes involved in corticogenesis occur during pregnancy, while others such as the maturation and refinement of cortico-cortical connections, including the commissural connections, mostly occur postnatally (Innocenti, 1991). Telencephalic commissures in mammals are necessary for the transfer of information between cerebral hemispheres and consequently for normal telencephalic function (Innocenti, 1991, 1995). Several studies have associated developmental alterations of the telencephalic commissures with psychiatric diseases such as dyslexia (Hynd et al., 1995), attention deficit-hyperactivity disorder (ADHD; Hynd et al., 1991), autism spectrum disorder (ASD; Piven et al., 1997) and schizophrenia (Innocenti et al., 2003). Abnormal connectivity of limbic and several neocortical areas that are contra laterally connected through the anterior commissure (AC) have been found in some of these diseases. Altered emotion, controlled by limbic areas, has been associated with bipolar disorder (LeDoux, 2000; Saxena et al., 2012; Townsend et al., 2013; Janiri et al., 2017) and ADHD (Humphreys et al., 2016). Recently, magnetic resonance imaging (MRI), has been used to observe abnormal development of interhemispheric connections in children born to women treated for hypothyroidism at different periods of pregnancy, demonstrating the contribution of maternal thyroid hormone to this process (Samadi et al., 2015). Electron microscopy (EM) data showed a significant reduction in the number of myelinated axons in the AC of gestational and postnatal hypothyroid adult rats (Berbel et al., 1994), but the effect of early transient postnatal hypothyroidism on the maturation of telencephalic commissures remains unknown.

Our aim was to study the postnatal development of the AC, from birth to adult, in transient and chronic hypothyroid rats using *in vivo* MRI and EM, and observe their recovery after delayed L-thyroxine (T₄)-treatment. T₂-ratio (T₂r; see methods) was correlated with quantitative EM data. The g-ratio (see methods) and conduction velocity of myelinated axons were estimated.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

Animal care and drug administration were performed under veterinary control according to European Union Directive 86/609/EEC with approval from the Ethics Committee of the UMH and CSIC.

Animals and treatments

Wistar rats were housed in temperature-controlled (22-24°C) animal quarters, with automated light and darkness cycles of 14 and 10 h. Young adult females, weighing 250-300 g, were mated with embryonic day (E) 0 counted when vaginal plug was detected. Hypothyroidism was induced by adding 0.02% methimazole (MMI, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) to the drinking water. Four groups of MMI treated rats were studied (**Figure 1**). The MMI_{E10} group was treated from E10 to postnatal day (P) 150 and 170, and then sacrificed. MMI_{P0-21} and MMI_{P0} groups were treated from P0 to P21 and P150, respectively, both being sacrificed at P150. The MMI_{P0-21}+T4_{P15-21} group had the same treatment as MMI_{P0-21} pups with the addition of T4 (2.4 µg/100 g of body weight/day) from P15 to P21 (sacrificed at P150). T4 was administered using osmotic mini-pumps subcutaneously with a delivering ratio of 1 µL/h/day (ALZET, model 2001; Alza Corporation, Mountain View, CA). All MMI-treated rats received 1% KClO₄ with the MMI drinking solution up to P21. In the text, MMI_{P0-21} and MMI_{P0-21}+T4_{P15-21} groups are referred to collectively as transient hypothyroid rats, except when significant differences between these two groups were found. In a similar way, MMI_{P0} and MMI_{E10} groups are referred to as chronic hypothyroid rats. Control (C) rats were sacrificed at P150, P180 and P365. Four litters per group were used and culled to 8 pups per litter. After weaning, dams and female pups were anesthetized by 1.5-2% isoflurane inhalation (Laboratorios Dr. Esteve, S.A., Barcelona, Spain) in O₂ (0.9 L O₂/min) and sacrificed by decapitation. Only male pups were used in this study.

Determination of total T3 and T4 concentrations in plasma

Under isoflurane anaesthesia, 8 rats per group (2 per litter) were weighted (**Figure 2A**) and blood samples (approx. 1 mL) taken from the heart ventricle using a heparinized syringe, at P15, P21 and P50. The blood was spun off and plasma kept at -20°C. Following extraction and purification of the plasma samples, total thyroid hormone concentrations were obtained by radioimmunoassay (Morreale de Escobar et al., 1985).

Electron microscopy

Four rats per group (1 per litter) were processed for EM at P150. Rats were anaesthetized by 1.5-2% isoflurane inhalation (Laboratorios Dr. Esteve, S.A., Barcelona, Spain) in medical air (0.9 L/min) and perfused with saline and then fixed with 4% paraformaldehyde, 1% glutaraldehyde, 0.1M sucrose, 0.002% CaCl₂ in 0.1M phosphate buffer (PB; pH:7.3-7.4). The brains were removed and post-fixed by immersion in the same fixative overnight, at 4°C. They were vibratome sectioned sagittally into 250 µm slices. The two most medial slices from each hemisphere were post-fixed in 2% OsO₄ for 30 min at room temperature and stained in 2% uranyl acetate in the dark for 1 h at 4°C, dehydrated in ethanol, immersed in propylene oxide (Lab Baker, Deventry, Holland) and embedded overnight in Araldite (Durcupan, Fluka, Buchs SG, Switzerland). Ultramicrotome (Ultracut UC-6, Leica, Heidelberg, Germany) semithin sections (1.5 µm) were stained with 1% toluidine blue and ultrathin sections (60-70 nm) with lead citrate. Images were obtained with a transmission electron microscope (FEI Tecnai Spirit G2, Eindhoven, The Netherlands), using a digital camera (Morada, Soft Imaging System, Olympus).

Mid-sagittal transversal area of AC, anterior (ant-l) and posterior (post-l) limbs were measured from semi-thin sections. Evenly spaced EM photomicrographs of each AC were taken at 16,500x magnification; 6 in ant-l and 4 in post-l (**Figure 6B** dots). Axon density, unmyelinated and myelinated axon inner diameter, and myelin thickness were obtained from plots using the Cellgraph system (Microptic S.L., Barcelona, Spain). Unmyelinated and myelinated axon

number in ant-I and post-I was calculated by multiplying the mean axon density by the corresponding mid-parasagittal area measured in semi thin sections (see details in Guadaño-Ferraz et al., 1994). Myelinated axon outer diameter was calculated from axon inner diameter and myelin thickness. The ratio between inner and outer myelinated axon diameter (g-ratio), as well as the conduction velocity taken as 5.5 times the outer axon diameter (Sanders and Whitteridge, 1946; Waxman and Bennett, 1972; Innocenti, 2017) were calculated. The g-ratio indicates the percentage of myelin thickness with respect of the outer diameter of the axon since the percentage of myelin thickness = $(1 - \text{g-ratio}) \times 100$. A higher g-ratio corresponds to a lower percentage myelin thickness (Stikov et al., 2015) and is also related to conduction velocity (Rushton, 1951).

MRI data acquisition and processing

For MRI data acquisition, rats were anesthetized in an induction chamber with 3-4% isoflurane in medical air (0.8-1 L/min) and maintained with 2% isoflurane during the scanning. Animals were placed in a custom-made MRI compatible holder with adjustable bite and ear bars, and then positioned on the magnet isocenter. Body temperature was maintained at $\sim 37^{\circ}\text{C}$ through a water heat-pad and monitored using a MRI compatible control unit (MultiSens Signal conditioner, OpSens, Quebec, Canada). Scans were obtained with a horizontal 7 Tesla scanner with a 30 cm diameter bore (Biospec 70/30v; Bruker Medical, Ettlingen, Germany), equipped with a 675 mT/m actively shielded gradient coil (Bruker Medical; BGA 12-S) of 11.4 cm inner diameter. A ^1H rat brain receive-only phase array coil with integrated combiner and preamplifier (no tune/no match) was used, in combination with an actively detuned transmit-only resonator (Bruker BioSpin MRI) and Paravision software (Bruker Medical).

Due to the AC antero-posterior diameter (ranging from 505 μm in P8 MMI_{E10} to 850 μm in P365 C rats) and MRI section thickness (500 μm), selection of the optimal coronal plane of study was crucial in order to avoid partial volume effects (i.e., grey matter overlap in AC). The final plane of study was determined from preliminary T2-weighted (T2w) images acquired in the three orthogonal planes using rapid acquisition relaxation enhanced sequence (RARE) with the following parameters: RARE factor 8, 15 slices, slice thickness 1 mm, field of view (FOV) 40x40 mm, matrix 256x256, effective echo time (TE_{eff}) 56 ms, repetition time (TR) 2000 ms, 1 average for 1 min 4 s total acquisition time (Hennig and Friedburg, 1988; Perez-Cervera et al., 2018). Using these anatomical images, final coronal MRI images were acquired using RARE sequence with the following parameters: RARE factor 8, 25 slices, slice thickness 0.5 mm, FOV 20x20 mm, matrix 200x200 (voxel size 100x100x500 μm^3), TE_{eff} 56 ms, TR 3728 ms, 4 averages for 12 min 26 s total acquisition time.

MRI images were obtained from 8 rats per group (2 rats per litter) at ages from P8 to P365 (vertical lines within bars in **Figure 1**; Supplementary Table 2) and analysed using ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). The region of interest (ROI) of the AC included the medial portion at ± 0.7 mm from of the midline (**Figure 3A**, vertical white lines in P150C). The T2 ratio (T_{2r}) was calculated as the ratio between the signal intensity of T2w in the ROI to that of T2w in a ROI in the lateral ventricle cerebrospinal fluid. T_{2r} was obtained in order to compare T2w signals between rats and experimental groups.

We measured contralateral distances between selected homotopic contralateral areas projecting through the AC using consecutive MRI scans, specifically the olfactory tubercle and the anterior piriform cortex projecting through ant-I, and perirhinal and posterior piriform cortices and lateral amygdaloid nucleus through post-I (including the stria terminalis; see schema in Guadaño-Ferraz et al., 1994; **Figure 12**; **Table 3**). Due to MMI brain shrinkage not found in C rats, anterior and posterior anatomical landmarks were used to identify equivalent projecting areas (Supplementary Figure 1). The anterior landmark was the point where the antero-lateral branch of the ant-I begins to appear transversally cut (at 1.89 mm from Bregma in C rats; Paxinos et al., 2015). At this level, olfactory tubercle and anterior piriform cortex were present in MMI and C rats. The posterior landmark was the point where lateral and medial habenular nuclei appeared darker than the adjacent neuropil (at -3.36 mm from Bregma in C rats; Paxinos et al., 2015). At this level, perirhinal and posterior piriform cortices and lateral amygdaloid nucleus were present in both MMI and C rats. Contralateral distances were measured between the central zones of the lateral amygdaloid nuclei and between mid-zones of pial surfaces in

other areas. Taking into account the 500 μm thickness of the MRI scans, distance measurements may have an antero-posterior error of about 250 μm per hemisphere. Conduction delay between homotopic areas was calculated from the mean distance between areas and conduction velocity (**Table 3**).

Statistical analysis

For statistical analysis, we used SYSTAT software (Systat Software, Inc., Chicago, IL). Mean frequency distributions of MRI and EM data were analysed using two-way ANOVA followed by either Tukey's (equal variances) or Games-Howell's (unequal variances) tests to identify significant differences ($P \leq 0.05$) between means among age and experimental groups. The plasma concentration of thyroid hormones was analysed using one-way ANOVA followed by either Tukey's test or the Student-Newman-Keuls method.

RESULTS

Body weight and thyroid hormone levels

In transient hypothyroid and control rats, body weight rapidly increased to 400 ± 20 g by P150 and then more slowly to 446 ± 13 g in C rats at P365. Weight gain was significantly lower ($P < 0.001$) in chronic hypothyroid rats with an average value of 75 ± 25 g at P150 (**Figure 2A**).

At P15, plasma concentration levels of total T4 (tT4) and total T3 (tT3) in MMI rats had an average value of 7.2 and 0.05 ng/ml respectively, and were significantly lower ($P < 0.001$) than the control averages of 40.1 ng tT4/ml and 0.26 ng tT3/ml. Normal levels of tT4 and tT3 were reached at P21 in MMI_{P0-21}+T4_{P15-21} rats and at P50 in MMI_{P0-21} rats. Levels of tT4 and tT3 in P50 chronic hypothyroid rats, was significantly lower ($P < 0.001$) than in transient hypothyroid and C rats of the same age (**Figures 2B,C**; Supplementary Table 1).

MRI data

AC appeared lighter than the adjacent neuropil in MRI scans of both MMI and C rats at an early age, with the AC being hardly distinguishable. T_{2r} progressively decreased with age and at $T_{2r} \leq 0.45$ which occurred at P22 in C rats and at older ages in MMI rats, AC darkened and showed increased border definition (arrows and bold lines in **Figures 3A,B**; Supplementary Table 2). The AC remained hardly distinguishable in MMI_{P0} at P40 and in MMI_{E10} rats at P60 (arrowheads in **Figure 3A**). In C rats, T_{2r} decreased rapidly from P8 ($T_{2r} = 0.59 \pm 0.01$) to P40 ($T_{2r} = 0.26 \pm 0.02$) and then more slowly, reaching $T_{2r} = 0.21 \pm 0.01$ at P365. MMI rat, T_{2r} also decreased rapidly from P8 to P40 but remained higher than controls (**Figure 3B**; Supplementary Table 2). At P40, significant T_{2r} differences ($P < 0.05$) were found between MMI_{P0-21}+T4_{P15-21}, MMI_{P0-21} and MMI_{P0} rats, which showed even greater differences ($P < 0.001$) with respect to C and MMI_{E10} rats (**Figure 3C**; Supplementary Table 2). At P150, T_{2r} was similar in transient hypothyroid rats but not to C ($P < 0.05$), MMI_{P0} ($P < 0.05$) and MMI_{E10} ($P < 0.001$) rats (**Figure 3C**; Supplementary Table 2). These data show that AC maturation might be delayed, at least until P150, in transient and chronic hypothyroid rats.

The biological significance of T_{2r} was explored by correlating these values with quantitative EM data, and generating the corresponding regression functions. Using the EM data from the AC in C rats at different postnatal ages (Berbel et al., 1994), we found a significant correlation between T_{2r} and myelinated axon number ($R^2 = 0.96$; **Figures 4A,B**) and percentage ($R^2 = 0.96$; **Figures 4C,D**). Unmyelinated axon number ($R^2 = 0.79$; **Figures 4E,F**) correlated poorly with T_{2r} . In order to validate these correlations, we used them to estimate myelinated axon number and percentage in MMI_{E10} rats and compare the values obtained with those published in the literature (**Figures 4A,B**). No significant differences were found between estimated MMI_{E10} values and those in previously published EM studies (MMI_{E10} and MMI_{E10}+T_{P6} groups in Berbel et al., 1994; **Figures 5A,B**). Consequently, these regression functions were used to estimate myelinated axon number and percentage for C, transient and chronic hypothyroid rats. At P150, these estimations indicated a significant decrease in myelinated axon

number in transient hypothyroid (17.0%), MMI_{P0} (36.8%) and MMI_{E10} (65.9%) rats with respect to C rats (**Figure 5C**). A similar decrease was also found in myelinated axon percentage with respect to C rats (**Figure 5D**).

EM study

The ultrastructure of neuron, glial cell somata and commissural axons in ant-I and post-I (**Figure 6**) was similar to that previously described in C (Sturrock, 1975, 1977; Guadaño-Ferráz et al., 1994; Larriva-Sahd et al., 2002) and MMI-treated (Guadaño-Ferráz et al., 1994) rats. The increased myelinated axon density in ant-I compared to post-I in each group (compare **Figures 6C,G,K,O,S** with **Figures 6D,H,LP,T**, respectively), and the decreased myelinated axon density in ant-I and post-I of chronic hypothyroid compared to transient hypothyroid and C rats (compare **Figures 7O,S** with **7C,G,K**, and **7P,T** with **7D,H,L**, respectively) is noteworthy. The AC mid-sagittal area was $201,428 \pm 10,377 \mu\text{m}^2$ in C rats and significantly decreased to $174,204 \pm 4,346 \mu\text{m}^2$ in transient hypothyroid ($P < 0.05$), and to $123,988 \pm 7,842 \mu\text{m}^2$ in chronic hypothyroid rats ($P < 0.001$), representing a 13.5 % and 38.4 % reduction, respectively with respect to C rats. Ant-I area in C and MMI rats was, on average, 72.3 % of the total AC area (left outlines in **Figure 6**)

In agreement with previous data, the total AC axon number was similar in C and MMI rats at P150, ranging from 1,009,160 axons in MMI_{P0} to 1,114,058 axons in MMI_{E10} rats (1,088,607 in C rats; **Table 1**). However, myelinated axon number decreased significantly in transient 16.9% ($P < 0.05$) and chronic 55.2% ($P < 0.001$) hypothyroid rats, with respect to C rats (**Figure 7; Table 1**). In all experimental groups, ant-I myelinated axon number was higher than in post-I (72.3% axons in C, 73.2% in transient and 82.5% in chronic hypothyroid rats; **Figures 7E,F; Table 1**). Similar differences were found in myelinated axon percentage (**Figures 7H,I; Table 1**). AC myelinated axon number and percentage was similar to that estimated using regression functions for C rats. There were 288,765 myelinated axons in C compared to the 292,645 estimated, 239,707 transient compared to 234,880 estimated and 129,231 chronic hypothyroid compared to 133,427 estimated (**Figure 8A**), giving the following percentages of real and estimated myelinated axons: 26.9 and 29.6% in C; 23.2 and 23.0% in transient; 12.4 and 12.3% in chronic hypothyroid rats (**Figure 8B**).

There were no significant differences in average unmyelinated and myelinated axon inner diameter in the AC of C and MMI rats (0.21 ± 0.07 and $0.53 \pm 0.20 \mu\text{m}$, respectively; **Table 2**). In ant-I, unmyelinated axon diameter was similar between groups (on average, $0.21 \pm 0.06 \mu\text{m}$). Myelinated axon inner diameter decreased ($P < 0.05$) in chronic hypothyroid rats ($0.52 \pm 0.17 \mu\text{m}$) compared to transient hypothyroid and C rats ($0.55 \pm 0.22 \mu\text{m}$); **Figures 9A,D,G,J,M; Table 2**). Post-I average axon diameter was similar in C and MMI rats for both unmyelinated ($0.21 \pm 0.07 \mu\text{m}$) and myelinated ($0.51 \pm 0.18 \mu\text{m}$) (**Figures 10A,D,G,J,M; Table 2**). In ant-I and post-I of C rats, 3.5% of the myelinated axons had an inner diameter greater than $1.0 \mu\text{m}$, whilst in transient rats it was 1.6% and in chronic hypothyroid 0.9% (**Figures 9A,D,G,J,M** and **10A,D,G,J,M**).

The average myelin thickness of AC (0.086 ± 0.027) and ant-I ($0.094 \pm 0.027 \mu\text{m}$) in chronic hypothyroid rats increased significantly ($P < 0.05$) compared to transient hypothyroid and C rat AC (0.083 ± 0.030) and ant-I ($0.089 \pm 0.035 \mu\text{m}$). (**Table 2**). Chronic hypothyroid average myelin thickness also increased significantly to 0.078 ± 0.018 ($P < 0.05$) in post-I, compared to an average of $0.073 \pm 0.018 \mu\text{m}$ in the other groups; **Figures 9B,E,H,K,N, 10B,E,H,K,N** and **Table 2**). No significant correlation was found between myelin thickness and inner axon diameter in ant-I and post-I. Notwithstanding, the slope of the ant-I regression function was higher (on average, 3.9 ± 0.6 deg) than in post-I (on average, 0.9 ± 0.4 deg; **Figures 9C,F,I,L,O** and **10C,F,I,L,O**).

In chronic hypothyroid AC the average ant-I g-ratio (0.73 ± 0.07) decreased significantly ($P < 0.05$) compared to the 0.75 ± 0.07 ratio in C and transient hypothyroid rats (**Figures 11A,C,E,G,I** and **Table 2**). Similar MMI and C post-I g-ratios (0.76 ± 0.08) were found (**Figures 11B,D,F,H,J** and **Table 2**). The regression function between inner axon diameter and g-ratio was of a similar slope between C and MMI rats, being higher in post-I (16.7 deg) than in ant-I (11.3 deg; **Figure 11**).

Conduction velocity was similar between C and MMI rats, being lower in post-I (3.64 ± 1.04 m/s average) than in AC and ant-I (3.94 ± 1.31 m/s average; **Table 2**). The conduction delay between ant-I, and the olfactory tubercle and anterior piriform cortex decreased in transient (on average, 8.2%) and chronic hypothyroid rats (on average, 32.5%) with respect to C (**Figure 12** and **Table 3**). The conduction delay between perirhinal and posterior piriform cortices and lateral amygdaloid nucleus in post-I, also decreased in transient (on average, 9.5%) and chronic hypothyroid rats (on average, 24.2%) with respect to C (**Figure 12** and **Table 3**).

DISCUSSION

Our results show that early postnatal transient and chronic hypothyroidism alters anterior commissure maturation, which cannot be recovered after delayed T4-treatment. T_{2r} is correlated with myelinated axon number and percentage in the AC of C and MMI rats. Using the corresponding regression functions, myelinated axon number and percentage of MMI rats at P150 was estimated and found to be similar to EM values, showing a decreased percentage and number of myelinated axons in MMI with respect to C rats at P150. g-Ratio was similar between MMI and C rats, but myelinated axon conduction delay decreased in both ant-I and post-I of MMI rats due to their shorter commissural tracts.

Methodological considerations. Limitations and strengths

The major strength of this work is the combination of non-invasive *in vivo* neuroimaging of AC maturation with an *ex vivo* quantitative study of unmyelinated and myelinated axon number and diameter using electron microscopy. The quantitative data confirmed delayed AC maturation correlated with T_{2r} .

The study was limited to male rats, since gender based differences have been reported in the mid-sagittal AC area of several mammals including rats (Noonan et al, 1998) and humans (Allen and Gorski, 1992). In rats the postero-dorsal region of the medial amygdala and the encapsulated region of the stria terminalis were found to be 97.4 and 85.2% larger, respectively, in male rats, affecting the number of axons connecting through the post-I and stria terminalis (Hines et al., 1992). The use of male pups avoids possible gender based differences in AC mid-sagittal area and unmyelinated and myelinated axon number.

EM methodology and measurement taking is particularly time consuming, and as such the EM study sample size was relatively low. The final number of rats per group was limited to four, given that data obtained for MMI_{E10} and C rats at P150 was similar to our estimated values and to quantitative values obtained in previous studies (Gravel et al., 1990; Guadaño-Ferraz et al., 1994; Berbel et al., 1994). Although reduced, this sample size can be considered sufficient to evaluate mean measurement differences between ant-I and post-I and experimental groups.

The fact that T_{2r} may not be specific to myelination must be considered. Previous studies suggest that variation in T_{2r} reflects changes in histological characteristics of nervous tissue, such as increased myelination and reduction of extracellular space (Chandran et al., 2012; Thiessen et al., 2013; Tsurugizawa et al., 2013; Alonso-Ortiz et al., 2015; Jelescu et al., 2016). In control rats, T_{2r} decreased rapidly from P8 to P50, and at a slower pace up to P100 after which it levelled off. The P8-100 decrease is highly correlated to an increased number and percentage of myelinated axons, as seen in previous studies (Berbel et al., 1994). EM studies have shown however, that myelinated axon number in the AC continues to increase after P100 in parallel with an increased number of glial cells and reduced extracellular space (Gravel et al., 1990; Berbel et al., 1994). No relevant changes in T_{2r} were observed after P100 in MMI and C rats, suggesting that changes in myelinated axon number are undetectable with currently available MRI technique. This is the case of patients who suffer toxic leucoencephalopathy associated with the use of drugs such as opioids and cocaine (Buttner and Weis, 2006; Alturkustani et al., 2017) in which demyelination of commissural and white matter axons in the cerebral cortex becomes detectable in MRI scans at an advanced stage of the disease (Phan-Ba et al., 2012). Diffusion image measurements of amygdala-lesioned young monkeys are

relatively insensitive to white matter changes during recovery (Grayson et al., 2017). This is relevant since early detection by T2w MRI scans of some neurological and psychiatric diseases that affect myelination of cortical axons, and other important factors may not be possible. MRI approaches have been developed to study subtle developmental changes. Enhanced MRI through Mn²⁺ injection (MEMRI; Chan et al., 2012) will provide a useful tool to study commissural connectivity. The diffusion kurtosis image (DKI) is highly sensitive and directionally specific when detecting ultrastructural changes in the brain maturation processes (Cheung et al., 2009). Approaches such as these will add valuable information to the study of developmental ultrastructural changes in white matter and the plasticity of commissural connections in normal and hypothyroid rats.

Altered interhemispheric transfer of information in MMI rats

The interhemispheric transfer of information through telencephalic commissures depends on several intrinsic and extrinsic factors, which modulate axon characteristics such as morphology and function. Axon length and inner diameter, myelin thickness and intermodal distances are among the principal factors determining axon function (Rushton, 1951; Waxman, 1975). Importantly, inner diameter and myelin thickness are linked to axon conduction velocity, which combined with axon length relates to conduction delay. These parameters are well established for myelinated axons but remain relatively unknown for unmyelinated axons. Axon diameter has also been related with the size of terminal arbores and boutons of callosal axons in monkeys (Innocenti, 2011; Innocenti and Caminiti, 2017).

In ant-I and post-I, unmyelinated and myelinated axon inner diameter was similar between transient hypothyroid and C rats (**Table 2**), while myelinated axon inner diameter and g-ratio decreased in the ant-I of chronic hypothyroid rats with respect to transient hypothyroid and C rats (**Table 2**). Conduction velocity of myelinated axons was similar in C and MMI rats (although lower in post-I than in AC and ant-I). These data suggest that the transfer of information between hemispheres carried out by unmyelinated and myelinated axons is similar in MMI and C rats. However, myelinated axon number and percentage significantly decreased in transient (on average, 16.9%) and chronic (on average, 55.2%) hypothyroid rats compared to controls, reflecting an increase in the percentage on unmyelinated axons since the total axon number remained similar in C and MMI rats (**Table 1**). The increased number and percentage of unmyelinated axons found in MMI rats results in an overall decrease in conduction velocity, assuming that the conduction velocity of unmyelinated axons is lower than in myelinated, which have a greater inner diameter. While axon diameter and myelination are associated, the length of commissural axons depends on other additional factors. However, since the distance between homotopic areas connected through the AC was less in MMI rats, the corresponding conduction delays estimated from myelinated axon parameters decreased. The study of telencephalic commissures provides additional important information about non-commissural axons (Innocenti, 2017). The decreased number of myelinated axons found in the AC of transient and chronic hypothyroid rats may also reflect abnormal ipsilateral and subcortical connections in cortical areas connected through the AC.

No data has been previously published concerning the mean g-ratio in AC of rats which is similar to those observed in other species, usually ranging between 0.6-0.8 (Chomiak and Hu, 2009; Campbell et al., 2017; Innocenti, 2017). However, myelinated axon percentage in control mice at P240 (29.0%) was similar to that found in C rats at P150 (31.1 ± 4.7%) and at P365 (38.2%; Berbel et al., 1994). Myelinated axon diameter (0.53 ± 0.19 µm in mice at P240 vs 0.55 ± 0.23 in C rats at P150) also remained similar. Although myelin thickness in mice was not calculated by Sturrock (1975), the mean number of myelin lamellae (7.1 ± 3.4) at P240 was similar to that found in C rats at P150 (on average, 7.2; unpublished results), which strongly suggests that myelin thickness was also similar between mice and rats, resulting in similar g-ratio and conduction velocity.

Altered behaviour in MMI rats

Four axon bundles merge to form the AC of rats. Two merge in ant-I and contain axons from anterior olfactory nucleus, anterior piriform cortex and olfactory tubercle. Another forms post-I and contains axons from posterior piriform, perirhinal and temporal cortices, and lateral

amygdaloid nucleus. The fourth bundle adjacent to post-I is the stria terminalis and contains axons from lateral olfactory tract nucleus, and basolateral, basomedial and cortical nuclei of amygdala (see scheme and references in Guadaño-Ferráz et al., 1994). In primates, commissural projecting areas spread out more than in rodents and the AC also receives axons from virtually the entire temporal lobe, area 13 of orbitofrontal cortex, frontal and temporal subdivisions of pre-piriform cortex, and cortical and deep nuclei of amygdala (Demeter et al., 1990). In humans, projecting areas through the AC also include the inferior part of temporal and occipital lobes, occipital convexity and possibly central fissure and prefrontal convexity (Di Virgilio et al., 1999; Patel et al., 2010). In particular, amygdaloid nuclei play a key role in the modulation of emotion and emotion associated states (Marks, 1987; LeDoux, 2012, 2014). The amygdala receives conditioned stimuli from sensory inputs, mediates defensive reactions (such as freezing, autonomic nervous system activity and hormonal release) by modulating hypothalamic nuclei activity and manages goal-directed actions by modulating ventral striatum activity (Davis et al., 2010; LeDoux, 2000; 2012). Alterations in emotion may lead to different mental illness and have been associated with diseases such as bipolar disorder (LeDoux, 2000; Saxena et al., 2012; Townsend et al., 2013; Janiri et al., 2017) and ADHD (Humphreys et al., 2016). In rats, AC projecting areas are involved mostly in olfactory, anxiety and fear behaviour (Amaral, 2003).

Early postnatal and chronic hypothyroid rats showed a marked preference for open arms in the elevated plus maze test (Navarro et al., 2015). Time spent in open arms was 81.1% for MMI_{E10-P40} and 57.0 % for MMI_{P0-P40} rats compared to 17.1% for C rats. The number of arm transitions significantly decreased in MMI-treated rats (on average, 4.2 compared to 12.3 transitions in controls). Hypothyroid rats frequently fell from the apparatus, and this behaviour was associated with a deterioration in sensory perception (Navarro et al., 2015). Our data show that commissural connections between amygdaloid areas are altered in transient and chronic hypothyroid rats, which may lead to decreased anxiety and an altered perception of danger. The abnormal behaviour observed in the elevated plus maze test of chronic hypothyroid rats could be due to both deteriorated perception and alterations of anxiety and fear. The altered maturation of the AC may lead to an increase in impulsive decisions (Bari and Robbins, 2013) which change from adolescence to adulthood (Hunt et al., 2016). Transcriptional T3-regulated genes involved in the juvenile-adult transition of vertebrates have been described (Chatonnet et al., 2015). Delayed perception of dangerous environments and fear in MMI rats suggests a protracted juvenile-like behaviour in which arrested AC maturation may play a role.

Implications for neurological and psychiatric diseases in humans

In rodents, several hundred genes regulated by T3 at the transcriptional level are known to be involved in basic neurodevelopmental events (Morte et al., 2010, Chatonnet et al., 2015; Gil-Ibañez et al., 2014, 2017), and some of these genes have also been found mutated in humans suffering neurological and mental diseases (Berbel et al., 2014). Although postnatal cerebral cortex maturation is comparatively longer in humans than in rats (Marín-Padilla, 1978), similarities have been established since most of these T3-regulated genes are involved in evolutionary preserved pathways affecting the establishment of neural connections (Morte et al., 2010; Chatonnet et al., 2015; Berbel et al., 2014). Postnatal hypothyroid rats have been used to mimic human congenital hypothyroidism (Balázs, 1969; Morreale de Escobar et al., 1983), and genes involved in neuron-glia adhesion, affecting myelination, have been found to be under-expressed in these rats (Rodríguez-Peña et al., 1993, Rodríguez-Peña, 1999; Barradas et al., 2001; Sharlin et al., 2008). Some are implicated in schizophrenia and bipolar disorders (Tkachev et al., 2003) as is the case for myelin basic protein (MBP; Schoonover et al., 2004) and autotaxin (Fuss et al., 1997; Fox et al., 2003; Haas et al., 2004). The Erk1/2 pathway is involved in autotaxin-promoted oligodendrocyte maturation (Liu et al., 2011; Lee and Petratos, 2016) and its expression is decreased in late foetal hypothyroid rats (Berbel et al., 2010). The decreased number and percentage of myelinated axons found in transient and chronic hypothyroid rats might result from not only arrested axon growth but also the decreased proliferation of oligodendrocyte precursors and their maturation due to postnatal thyroid hormone deficiency, albeit transient.

CONCLUSIONS

To conclude, T_{2r} increases in the AC of transient and chronic hypothyroid rats and these values correlated with myelinated axon number and percentage in C rats. Quantitative EM data showed that myelinated axon number and percentage decreases in MMI rats at P150, indicating altered connectivity between commissural connected areas in MMI rats. The number and percentage of myelinated axons were similar to those estimated from regression functions obtained from T_{2r} . g-Ratio in ant-I and post-I was similar in MMI and C rats, being low in ant-I, because of decreased axon diameter. Conduction delay decreased in MMI rats coinciding with the reduced length of commissural tracts. The AC in MMI rats at P150 showed an impaired axonal maturation that could not be recovered by delayed T4-treatment. Mammals share T3-regulated genes involved in basic signalling pathways during the development and maturation of cortico-cortical connections. Our data may help to a better understanding of the physiopathology of congenital hypothyroidism and calls to attention the increased risk for children suffering postnatal hypothyroidism, albeit transitory, of suffering neurocognitive delay as well as possible psychiatric disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M.M. Moreno for technical help, and S. Ingham and Prof. P. Pacheco for critical reading of the manuscript. This work was funded by grants of the Fundación Alicia Koplowitz (Spain) and of the Spanish “Ministerio de Economía, Industria y Competitividad” MINECO-SAF2014-58256-R to PB, MINECO-BFU2015-64380-C2-1-R to SC and of the Spanish “Generalitat Valenciana” GV-PROMETEOII/2014/075 to JMG-V. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.



REFERENCES

- Allen LS, Gorski RA. Sexual orientation and the size of the anterior commissure in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89:7199–202.
- Alonso-Ortiz E, Levesque IR, Pike GB. MRI-based myelin water imaging: A technical review. *Magn Reson Med* (2015) 73:70-81. doi: 10.1002/mrm.25198.
- Alturkustani M, Ang LC, Ramsay D. Pathology of toxic leucoencephalopathy in drug abuse supports hypoxic-ischemic pathophysiology/etiology. *Neuropathology* (2017) 37:321-8. doi: 10.1111/neup.12377.
- Amaral DG. The amygdala, social behavior, and danger detection. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 1000:337-47.
- Aycan Z, Cangul H, Muzza M, Bas VN, Fugazzola L, Chatterjee VK, et al. Digenic DUOX1 and DUOX2 mutations in cases with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* (2017) 102:3085-90. doi: 10.1210/jc.2017-00529.
- Balázs, R., Brooksbank, B.W., Davison, A.N., Eayrs, J.T., Wilson, D.A. The effect of neonatal thyroidectomy on myelination in the rat brain. *Brain Res* (1969) 15:219–32.
- Bari A, Robbins TW. Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. *Prog Neurobiol* (2013) 108:44-79. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.06.005.
- Barradas PC, Vieira RS, De Freitas MS. Selective effect of hypothyroidism on expression of myelin markers during development. *J Neurosci Res* (2001) 66:254-61.
- Berbel P, Guadaño-Ferraz A, Angulo A, Ramón Cerezo J. Role of thyroid hormones in the maturation of interhemispheric connections in rats. *Behav Brain Res* (1994) 20:9-14.
- Berbel P, Morreale de Escobar G. (2011). "Iodine and brain development", in *International Handbook of Behavior Food and Nutrition*, eds. V.R. Preedy, R.R. Watson, C.R. Martin (New York: Springer), 2105-34.
- Berbel P, Navarro D, Ausó E, Varea E, Rodríguez AE, Ballesta JJ, et al. Role of late maternal thyroid hormones in cerebral cortex development: an experimental model for human prematurity. *Cereb Cortex* (2010) 20:1462-75.
- Berbel P, Navarro D, Román GC. An evo-devo approach to thyroid hormones and cerebral cortex development: etiological implications for autism. *Front Endocrinol* (2014) 5:146. doi: 10.3389/fendo.2014.00146.
- Berbel P, Obregon MJ, Bernal J, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G. Iodine supplementation during pregnancy: a public health challenge. *Trends Endocrinol Metab* (2007) 18:338-43.
- Brown RS. "Disorders of the thyroid gland in infancy, childhood and adolescence." In: DeGroot LJ, editor. *Thyroid Disease Manager*. South Dartmouth, MA: Endocrine Education Inc. (2012). <http://www.thyroidmanager.org/>.
- Buttner A, Weis S. Neuropathological alterations in drug abusers: The involvement of neurons, glial, and vascular systems. *Forensic Sci Med Pathol* (2006) 2:115–26.
- Campbell JSW, Leppert IR, Narayanan S, Boudreau M, Duval T, Cohen-Adad J, et al. Promise and pitfalls of g-ratio estimation with MRI. *Neuroimage* (2017) S1053-8119:30685-7. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.08.038.

- Chan KC, Cheng JS, Fan S, Zhou IY, Yang J, Wu EX. In vivo evaluation of retinal and callosal projections in early postnatal development and plasticity using manganese-enhanced MRI and diffusion tensor imaging. *Neuroimage* (2012) 59:2274-83. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.09.055.
- Chandran P, Upadhyay J, Markosyan S, Lisowski A, Buck W, Chin CL, et al. Magnetic resonance imaging and histological evidence for the blockade of cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *Neuroscience* (2012) 202:446-53. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.051.
- Chatonnet F, Flamant F, Morte B. A temporary compendium of thyroid hormone target genes in brain. *Biochim Biophys Acta* (2015) 1849:122-9. doi: 10.1016/j.bbtagrm.2014.05.023.
- Cheung MM, Hui ES, Chan KC, Helpert JA, Qi L, Wu EX. Does diffusion kurtosis imaging lead to better neural tissue characterization? A rodent brain maturation study. *Neuroimage* (2009) 45:386-92. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.12.018.
- Chomiak T, Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* (2009) 4:e7754. doi: 10.1371/journal.pone.0007754.
- Clairman H, Skocic J, Lischinsky JE, Rovet J. Do children with congenital hypothyroidism exhibit abnormal cortical morphology? *Pediatr Res* (2015) 78:286-97. doi: 10.1038/pr.2015.93.
- Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* (2010) 35:105-35. doi: 10.1038/npp.2009.109.
- Demeter S, Rosene DL, Van Hoesen GW. Fields of origin and pathways of the interhemispheric commissures in the temporal lobe of macaques. *J Comp Neurol* (1990) 302:29-53.
- Di Virgilio G, Clarke S, Pizzolato G, Schaffner T. Cortical regions contributing to the anterior commissure in man. *Exp Brain Res* (1999) 124:1-7.
- Dussault JH, Ruel J. Thyroid hormones and brain development. *Annu Rev Physiol* (1987) 49:321-34.
- Fox MA, Colello RJ, Macklin WB, Fuss B. Phosphodiesterase-1 α /autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci* (2003) 23:507-19.
- Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB. Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci* (1997) 17:9095-103.
- Gil-Ibáñez P, Bernal J, Morte B. Thyroid hormone regulation of gene expression in primary cerebrocortical cells: role of thyroid hormone receptor subtypes and interactions with retinoic acid and glucocorticoids. *PLoS One* (2014) 9:e91692. doi: 10.1371/journal.pone.0091692.
- Gil-Ibáñez P, García-García F, Dopazo J, Bernal J, Morte B. Global Transcriptome Analysis of Primary Cerebrocortical Cells: Identification of Genes Regulated by Triiodothyronine in Specific Cell Types. *Cereb Cortex* (2017) 27:706-17. doi: 10.1093/cercor/bhv273.
- Gravel C, Sasseville R, Hawkes R. Maturation of the corpus callosum of the rat: II. Influence of thyroid hormones on the number and maturation of axons. *J Comp Neurol* (1990) 291:147-61.
- Grayson D, Bliss-Moreau E, Bennett J, Lavenex P, Amaral D. Neural Reorganization Due to Neonatal Amygdala Lesions in the Rhesus Monkey: Changes in Morphology and Network Structure. *Cereb Cortex* (2017) 27:3240-53.

Green SA, Goff B, Gee DG, Gabard-Durnam L, Flannery J, Telzer EH, Humphreys KL, Louie J, Tottenham N. Discrimination of amygdala response predicts future separation anxiety in youth with early deprivation. *J Child Psychol Psychiatry* (2016) 57:1135-44. doi: 10.1111/jcpp.12578.

Guadaño Ferraz A, Escobar del Rey F, Morreale de Escobar G, Innocenti GM, Berbel P. The development of the anterior commissure in normal and hypothyroid rats. *Brain Res Dev Brain Res* (1994) 81:293-308.

Guo S, Kendrick K, Zhang J, Broome M, Yu R, Liu Z. Brain-wide functional inter-hemispheric disconnection is a potential biomarker for schizophrenia and distinguishes it from depression. *NeuroImage: Clinical* (2013) 2:818-26.

Haas MJ, Mreyoud A, Fishman M, Mooradian AD. Microarray analysis of thyroid hormone-induced changes in mRNA expression in the adult rat brain. *Neurosci Lett* (2004) 365:14-8.

Hennig J, Friedburg H. Clinical applications and methodological developments of the RARE technique. *Magnetic Resonance Imaging* (1988) 6:391-5.

Hines M, Allen LS, Gorski RA. Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain Res* (1992) 579:321-6.

Humphreys KL, Tottenham N, Lee SS. Risky decision-making in children with and without ADHD: A prospective study. *Child Neuropsychol* (2016) 24:261-76. doi: 10.1080/09297049.2016.1264578.

Hunt PS, Burk JA, Barnet RC. Adolescent transitions in reflexive and non-reflexive behavior: Review of fear conditioning and impulse control in rodent models. *Neurosci Biobehav Rev* (2016) 70:33-45. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.06.026.

Huo K, Zhang Z, Zhao D, Li H, Wang J, Wang X, et al. Risk factors for neurodevelopmental deficits in congenital hypothyroidism after early substitution treatment. *Endocr J* (2011) 58:355-61.

Hynd GW, Hall J, Novey ES, Eliopoulos D, Black K, Gonzalez JJ, Edmonds JE, Riccio C, Cohen M. Dyslexia and corpus callosum morphology. *Arch Neurol* (1995) 52:32-8.

Hynd GW, Semrud-Clikeman M, Lorys AR, Novey ES, Eliopoulos D, Lyytinen H. Corpus callosum morphology in attention deficit-hyperactivity disorder: morphometric analysis of MRI. *J Learn Disabil* (1991) 24:141-6.

Innocenti GM, Ansermet F, Parnas J. Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum. *Mol Psychiatry* (2003) 8:261-74.

Innocenti GM, Berbel P. Analysis of an experimental cortical network: I). Architectonics of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid; similarities with human microgyria. *J Neural Transplant Plast* (1991) 2:1-28.

Innocenti GM, Caminiti R. Axon diameter relates to synaptic bouton size: structural properties define computationally different types of cortical connections in primates. *Brain Struct Funct* (2017) 222:1169-77. doi: 10.1007/s00429-016-1266-1.

Innocenti GM. Development and evolution: two determinants of cortical connectivity. *Prog Brain Res* (2011) 189:65-75. doi: 10.1016/B978-0-444-53884-0.00018-X.

Innocenti GM. Exuberant development of connections, and its possible permissive role in cortical evolution. *Trends Neurosci* (1995) 18:397-402.

Innocenti GM. Network causality, axonal computations, and Poffenberger. *Exp Brain Res* (2017) 235:2349-57. doi: 10.1007/s00221-017-4948-x.

Janiri D, Sani G, Rossi P, Piras F, Iorio M, Banaj N, et al. Amygdala and hippocampus volumes are differently affected by childhood trauma in patients with bipolar disorders and healthy controls. *Bipolar Disord* (2017) 19:353-62. doi: 10.1111/bdi.12516.

Jelescu IO, Zurek M, Winters KV, Veraart J, Rajaratnam A, Kim NS, et al. In vivo quantification of demyelination and recovery using compartment-specific diffusion MRI metrics validated by electron microscopy. *Neuroimage* (2016) 132:104-14. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.02.004.

Kester MH, Martinez de Mena R, Obregon MJ, Marinkovic D, Howatson A, Visser TJ, et al. Iodothyronine levels in the human developing brain: major regulatory roles of iodothyronine deiodinases in different areas. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89:3117-28.

Kikinis Z, Fitzsimmons J, Dunn C, Vu MA, Makris N, Bouix S, et al. Anterior commissural white matter fiber abnormalities in first-episode psychosis: a tractography study. *Schizophr Res* (2015) 162:29-34. doi: 10.1016/j.schres.2015.01.037.

Köhler B, Schnabel D, Biebermann H, Gruters A. Transient congenital hypothyroidism and hyperthyrotropinemia: normal thyroid function and physical development at the ages of 6-14 years. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81:1563-7.

Krude H, Kühnen P, Biebermann H. Treatment of congenital thyroid dysfunction: Achievements and challenges. *Clin Endocrinol Metab* (2015) 29:399-413. doi: 10.1016/j.beem.2015.04.004.

Larriva-Sahd J, Condés Lara M, Martínez-Cabrera G, Varela-Echavarría A. Histological and ultrastructural characterization of interfascicular neurons in the rat anterior commissure. *Brain Res* (2002) 931:81-91.

Lazarus JH. Screening for thyroid dysfunction in pregnancy: is it worthwhile? *J Thyroid Res* (2011) 2011:397012. doi: 10.4061/2011/397012.

LeDoux JE. Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci USA* (2014) 111:2871-8. doi: 10.1073/pnas.1400335111.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* (2000) 23:155-84.

LeDoux JE. Evolution of human emotion: a view through fear. *Prog Brain Res* (2012) 195:431-42. doi: 10.1016/B978-0-444-53860-4.00021-0.

Lee JY, Petratos S. Thyroid hormone signaling in oligodendrocytes: from extracellular transport to intracellular signal. *Mol Neurobiol* (2016) 53:6568-83. doi: 10.1007/s12035-016-0013-1.

Léger J, dos Santos S, Larroque B, Ecosse E. Pregnancy outcomes and relationship to treatment adequacy in women treated early for congenital hypothyroidism: a longitudinal population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100:860-9. doi: 10.1210/jc.2014-3049.

Léger J. Congenital hypothyroidism: a clinical update of long-term outcome in young adults. *Eur J Endocrinol* (2015) 172:R67-77. doi: 10.1530/EJE-14-0777.

Li Y, Li F, He N, Guo L, Huang X, Lui S, et al. Neural hyperactivity related to working memory in drug-naive boys with attention deficit hyperactivity disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2014a) 53:116-22.

Li Z, Chang SH, Zhang L. Y, Gao L, Wang J. Molecular genetic studies of ADHD and its candidate genes: A review. *Psychiatry Res* (2014b) 219:10-24.

Liu X, Li Y, Zhang Y, Lu Y, Guo W, Liu P, et al. SHP-2 promotes the maturation of oligodendrocyte precursor cells through Akt and ERK1/2 signaling in vitro. *PLoS One* (2011) 6:e21058. doi: 10.1371/journal.pone.0021058.

- Marín-Padilla M. Dual origin of the mammalian neocortex and evolution of the cortical plate. *Anat Embryol* (1978) 152:109-26.
- Marks I. The development of normal fear: a review. *J Child Psychol Psychiatry* (1987) 28:667-97.
- Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F, Ruiz-Marcos A. "Thyroid hormone and the developing brain." In: Dussalt JH, Walker P, editors. *Congenital Hypothyroidism*. New York: Marcel Dekker (1983). p. 85-125.
- Morreale de Escobar G, Escobar del Rey F. "Consequences of iodine deficiency for brain development." In: deVijlder J, Morreale de Escobar G, editors. *The Thyroid and the Brain*. Stuttgart: Schattauer Verlag (2003) p. 33-56.
- Morreale de Escobar G, Pastor R, Obregon MJ, Escobar del Rey F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* (1985) 117:1890-900.
- Morte B, Díez D, Ausó E, Belinchón MM, Gil-Ibáñez P, Grijota-Martínez C, et al. Thyroid hormone regulation of gene expression in the developing rat fetal cerebral cortex: prominent role of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV pathway. *Endocrinology* (2010) 151:810-20. doi: 10.1210/en.2009-0958.
- Mukherjee P, Whalley HC, McKirdy JW, Sprengelmeyer R, Young AW, McIntosh AM, Lawrie SM, Hall J. Altered amygdala connectivity within the social brain in schizophrenia. *Schizophr Bull* (2014) 40:152-60. doi: 10.1093/schbul/sbt086.
- Navarro D, Alvarado M, Navarrete F, Giner M, Obregon MJ, Manzanares J, et al. Gestational and early postnatal hypothyroidism alters VGluT1 and VGAT bouton distribution in the neocortex and hippocampus, and behavior in rats. *Front Neuroanat* (2015) 9:9. doi: 10.3389/fnana.2015.00009.
- Noonan M, Smith MA, Kelleher K, Sanfilippo MA. Sex differences in anterior commissure size in the rat. *Brain Res Bull* (1998) 45:101-4.
- O'Callaghan MJ, Burns Y, Gray P, Harvey JM, Mohay HI, Rogers Y, et al. Extremely low birth weight and control infants at 2 years corrected age: a comparison of intellectual abilities motor performance growth and health. *Early Hum Dev* (1995) 40:115-28.
- Olivieri A, Corbetta C, Weber G, Vigone MC, Fazzini C, Medda E, et al. Congenital hypothyroidism due to defects of thyroid development and mild increase of TSH at screening: data from the Italian National Registry of infants with congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:1403-8. doi: 10.1210/jc.2012-3273.
- Patel MD, Toussaint N, Charles-Edwards GD, Lin JP, Batchelor PG. Distribution and fibre field similarity mapping of the human anterior commissure fibres by diffusion tensor imaging. *MAGMA* (2010) 23:399-408. doi: 10.1007/s10334-010-0201-3.
- Paxinos G, Watson Ch. Calabrese E, Badea A, Johnson GA. (2015). *MRI/DTI atlas of the rat brain*. New York: Elsevier.
- Pearce EN, Pino S, He X, Bazrafshan HR, Lee SL, Braverman LE. Sources of dietary iodine: bread, cows' milk, and infant formula in the Boston area. *J Clin Endocrinol Metab* (2004) 89:3421-24.
- Pearce EN, Stagnaro-Green A. Hypothyroidism in pregnancy: do guidelines alter practice? *Thyroid* (2010) 20:241-2. doi: 10.1089/thy.2010.0003.

Perez-Cervera L, Carames JM, Fernandez-Molla LM, Moreno A, Fernandez B, Perez-Montoyo E, Moratal D, Canals S and Pacheco-Torres J. Mapping functional connectivity in the rodent brain using electric-stimulation fMRI. *Methods Mol Biol* (2018) 1718:117-34.

Phan-Ba R, Lommers E, Tshibanda L, Calay P, Dubois B, Moonen G, et al. MRI preclinical detection and asymptomatic course of a progressive multifocal leucoencephalopathy (PML) under natalizumab therapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2012) 83:224-6. doi: 10.1136/jnnp-2011-300511.

Piven J, Bailey J, Ranson BJ, Arndt S. An MRI study of the corpus callosum in autism. *Am J Psychiatry* (1997) 154:1051-6.

Rodríguez-Peña A, Ibarrola N, Iñiguez MA, Muñoz A, Bernal J. Neonatal hypothyroidism affects the timely expression of myelin-associated glycoprotein in the rat brain. *J Clin Invest* (1993) 91:812-8.

Rodríguez-Peña A. Oligodendrocyte development and thyroid hormone. *J Neurobiol* (1999) 40:497-512.

Rovet JF, Ehrlich RM, Sorbara DL. Neurodevelopment in infants and preschool children with congenital hypothyroidism: etiological and treatment factors affecting outcome. *J Pediatr Psychol* (1992) 17:187-213.

Rovet JF, Simic N. The role of transient hypothyroxinemia of prematurity in development of visual abilities. *Semin Perinatol* (2008) 32:431-7.

Rovet JF. Congenital hypothyroidism: an analysis of persisting deficits and associated factors. *Child Neuropsychol* (2002) 8:150-62.

Rovet JF. Long-term neuropsychological sequelae of early-treated congenital hypothyroidism: effects in adolescence. *Acta Paediatr Suppl* (1999) 88:88-95.

Rushton WAH. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* (1951) 115:101-22.

Samadi A, Skocic J, Rovet JF. Children born to women treated for hypothyroidism during pregnancy show abnormal corpus callosum development. *Thyroid* (2015) 25:494-502. doi: 10.1089/thy.2014.0548.

Sanders FK, Whitteridge D. Conduction velocity and myelin thickness in regenerating nerve fibres. *J Physiol* (1946) 105:152-74.

Santos NC, Costa P, Ruano D, Macedo A, Soares MJ, Valente J, Pereira AT, et al. Revisiting thyroid hormones in schizophrenia. *J Thyroid Res* (2012) 2012:569147. doi: 10.1155/2012/569147.

Sava L, Delange F, Belfiore A, Purrello F, Vigneri R. Transient impairment of thyroid function in newborn from an area of endemic goiter. *J Clin Endocrinol Metab* (1984) 59:90-5.

Saxena K, Tamm L, Walley A, Simmons A, Rollins N, Chia J, et al. A preliminary investigation of corpus callosum and anterior commissure aberrations in aggressive youth with bipolar disorders. *J Child Adolesc Psychopharmacol* (2012) 22:112-9. doi: 10.1089/cap.2011.0063.

Schoonover CM, Seibel MM, Jolson DM, Stack MJ, Rahman RJ, Jones SA, et al. Thyroid hormone regulates oligodendrocyte accumulation in developing rat brain white matter tracts. *Endocrinology* (2004) 145:5013-20.

- Sharlin DS, Tighe D, Gilbert ME, Zoeller RT. The balance between oligodendrocyte and astrocyte production in major white matter tracts is linearly related to serum total thyroxine. *Endocrinology* (2008) 149:2527-36. doi: 10.1210/en.2007-1431.
- Stagnaro-Green A, Abalovich M, Alexander E, Azizi F, Mestman J, Negro R, et al. Guidelines of the American Thyroid Association for the diagnosis and management of thyroid disease during pregnancy and postpartum. *Thyroid* (2011b) 21:1081-125. doi: 10.1089/thy.2011.0087.
- Stagnaro-Green A, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Negro R. High rate of persistent hypothyroidism in a large-scale prospective study of postpartum thyroiditis in southern Italy. *J Clin Endocrinol Metab* (2011a) 96:652-7. doi: 10.1210/jc.2010-1980.
- Stikov N, Campbell JS, Stroh T, Lavelée M, Frey S, Novak J, Nuara S, et al. In vivo histology of the myelin g-ratio with magnetic resonance imaging. *Neuroimage* (2015) 118:397-405. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.05.023.
- Sturrock RR. A quantitative electron microscopic study of myelination in the anterior limb of the anterior commissure of the mouse brain. *J Anat* (1975) 119:67-75.
- Sturrock RR. Neurons in the mouse anterior commissure. A light microscopic, electron microscopic and autoradiographic study. *J Anat* (1977) 123:751-62.
- Thiessen JD, Zhang Y, Zhang H, Wang L, Buist R, Del Bigio MR, et al. Quantitative MRI and ultrastructural examination of the cuprizone mouse model of demyelination. *NMR Biomed* (2013) 26:1562-81. doi: 10.1002/nbm.2992.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* (2003) 362:798-805.
- Townsend JD, Torrisi SJ, Lieberman MD, Sugar CA, Bookheimer SY, Altshuler LL. Frontal-amygdala connectivity alterations during emotion downregulation in bipolar I disorder. *Biol Psychiatry* (2013) 73:127-35. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.06.030.
- Tsurugizawa T, Ciobanu L, Le Bihan D. Water diffusion in brain cortex closely tracks underlying neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci USA* (2013) 110:11636-41. doi: 10.1073/pnas.1303178110.
- Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, et al. Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries. *Lancet* (2007) 369:145-57.
- Waxman SG, Bennett MV. Relative conduction velocities of small myelinated and non-myelinated fibres in the central nervous system. *Nat New Biol* (1972) 238:217-9.
- Waxman SG. Integrative properties and design principles of axons. *Int Rev Neurobiol* (1975) 18:1-40.
- Wheeler SM, McLelland VC, Sheard E, McAndrews MP, Rovet JF. Hippocampal Functioning and Verbal Associative Memory in Adolescents with Congenital Hypothyroidism. *Front Endocrinol* (2015) 19:156-63. doi: 10.3389/fendo.2015.00163.
- Williams FL, Hume R. Perinatal factors affecting thyroid hormone status in extreme preterm infants. *Semin Perinatol* (2008) 32:398-402.
- Willoughby KA, McAndrews MP, Rovet JF. Effects of maternal hypothyroidism on offspring hippocampus and memory. *Thyroid* (2014) 24:576-84. doi: 10.1089/thy.2013.0215.

Tables

Table 1. Axon number and percentage at P150.

	C	MMI _{P0-21} + T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
Ant-l					
Unmyel. ax. no. (x10 ³)	462.2 ± 86.4	468.6 ± 71.9	438.1 ± 80.6	509.9 ± 56.3	576.5 ± 34.5
Myel. ax. no. (x10 ³)	208.8 ± 42.1	176.7 ± 34.7	174.3 ± 32.5	110.0 ± 25.0	104.6 ± 18.6
Myel. ax. %	31.1 ± 4.7	26.5 ± 4.6	26.9 ± 3.2	17.7 ± 3.0	15.4 ± 2.3
Post-l					
Unmyel. ax. no. (x10 ³)	337.6 ± 69.9	350.6 ± 48.0	347.4 ± 54.9	363.9 ± 38.6	414.6 ± 52.6
Myel. ax. no. (x10 ³)	80.0 ± 12.1	64.5 ± 15.9	63.9 ± 21.2	25.4 ± 10.4	18.5 ± 5.5
Myel. ax. %	19.2 ± 5.4	16.0 ± 3.5	16.0 ± 4.4	6.5 ± 2.8	4.3 ± 2.5
AC					
Unmyel. ax. no. (x10 ³)	799.8 ± 98.7	819.3 ± 85.2	785.6 ± 73.5	873.8 ± 81.9	991.1 ± 62.2
Myel. ax. no. (x10 ³)	288.8 ± 72.3	241.2 ± 62.8	238.2 ± 60.9	135.4 ± 46.5	123.1 ± 44.5
Myel. ax. %	26.5 ± 8.2	22.9 ± 6.7	23.4 ± 6.7	13.4 ± 5.6	11.1 ± 5.4

Data are mean ± SD. Four rats per group. Ax: axon. Unmyel.: unmyelinated. Myel.: myelinated. Ant-l: anterior limb. Post-l: posterior limb. AC: anterior commissure.



Table 2. Axon diameter (μm), myelin thickness (μm), g-ratio and conduction velocity (m/s) at P150.

	C	MMI _{P0-21} + T4 _{P15-21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
AC					
Unmyel axon diam. (median)	0.20 \pm 0.06 (0.20)	0.21 \pm 0.07 (0.21)	0.23 \pm 0.07 (0.23)	0.20 \pm 0.07 (0.19)	0.21 \pm 0.07 (0.20)
Myel axon inner diam. (median)	0.53 \pm 0.21 (0.49)	0.54 \pm 0.21 (0.50)	0.53 \pm 0.21 (0.51)	0.52 \pm 0.17 (0.50)	0.51 \pm 0.17 (0.49)
Myelin thickness (median)	0.083 \pm 0.033 (0.073)	0.083 \pm 0.031 (0.074)	0.081 \pm 0.026 (0.073)	0.089 \pm 0.028 (0.084)	0.090 \pm 0.025 (0.085)
g-ratio (median)	0.75 \pm 0.08 (0.76)	0.75 \pm 0.08 (0.76)	0.76 \pm 0.07 (0.76)	0.74 \pm 0.06 (0.74)	0.73 \pm 0.07 (0.73)
Conduction velocity (median)	3.80 \pm 1.38 (3.51)	3.87 \pm 1.32 (3.62)	3.83 \pm 1.29 (3.66)	3.84 \pm 1.12 (3.74)	3.84 \pm 1.04 (3.61)
Ant-l					
Unmyel axon diam. (median)	0.20 \pm 0.06 (0.19)	0.22 \pm 0.06 (0.22)	0.23 \pm 0.07 (0.23)	0.20 \pm 0.05 (0.19)	0.22 \pm 0.06 (0.22)
Myel axon inner diam. (median)	0.55 \pm 0.23 (0.50)	0.55 \pm 0.22 (0.51)	0.55 \pm 0.22 (0.51)	0.52 \pm 0.18 (0.49)	0.51 \pm 0.17 (0.49)
Myelin thickness (median)	0.090 \pm 0.039 (0.078)	0.089 \pm 0.034 (0.078)	0.088 \pm 0.031 (0.078)	0.093 \pm 0.028 (0.085)	0.094 \pm 0.025 (0.092)
g-ratio (median)	0.75 \pm 0.07 (0.75)	0.75 \pm 0.07 (0.75)	0.75 \pm 0.07 (0.76)	0.73 \pm 0.06 (0.73)	0.72 \pm 0.07 (0.72)
Conduction velocity (median)	3.99 \pm 1.51 (3.67)	3.98 \pm 1.41 (3.73)	3.98 \pm 1.41 (3.74)	3.90 \pm 1.15 (3.74)	3.85 \pm 1.08 (3.65)
Post-l					
Unmyel axon diam. (median)	0.20 \pm 0.06 (0.20)	0.21 \pm 0.08 (0.21)	0.22 \pm 0.07 (0.23)	0.21 \pm 0.08 (0.22)	0.20 \pm 0.07 (0.20)
Myel axon inner diam. (median)	0.49 \pm 0.19 (0.46)	0.52 \pm 0.20 (0.49)	0.52 \pm 0.19 (0.50)	0.52 \pm 0.14 (0.52)	0.51 \pm 0.16 (0.50)
Myelin thickness (median)	0.073 \pm 0.019 (0.069)	0.073 \pm 0.019 (0.070)	0.072 \pm 0.016 (0.070)	0.076 \pm 0.022 (0.070)	0.079 \pm 0.016 (0.079)
g-ratio (median)	0.75 \pm 0.08 (0.77)	0.77 \pm 0.07 (0.78)	0.77 \pm 0.07 (0.78)	0.77 \pm 0.06 (0.77)	0.75 \pm 0.07 (0.75)
Conduction velocity (median)	3.51 \pm 1.09 (3.34)	3.67 \pm 1.14 (3.47)	3.64 \pm 1.08 (3.61)	3.66 \pm 1.00 (3.73)	3.70 \pm 0.91 (3.60)

Data are mean \pm SD. Four rats per group. Diam: diameter; Myel: myelinated. Unmyel: unmyelinated. Ant-l: anterior limb. Post-l: posterior limb. AC: anterior commissure.

Table 3. Distance between areas projecting through the AC and conduction delay at P150.

		C	MMI _{P0-21} + T ₄ _{P15-P21}	MMI _{P0-21}	MMI _{P0}	MMI _{E10}
Ant-l						
Olfactory tubercle	Distance (mm)	14.6	13.5	13.2	9.8	8.9
	Conduction delay (ms)	3.7 ± 1.4	3.4 ± 1.2	3.3 ± 1.2	2.5 ± 0.7	2.3 ± 0.6
Anterior piriform cortex	Distance (mm)	15.3	14.3	13.7	10.4	10.1
	Conduction delay (ms)	3.8 ± 1.5	3.6 ± 1.3	3.4 ± 1.2	2.7 ± 0.8	2.6 ± 0.7
Post-l						
Perirhinal cortex	Distance (mm)	18.2	17.4	17.3	15	14.2
	Conduction delay (ms)	5.2 ± 1.6	4.7 ± 1.5	4.8 ± 1.4	4.1 ± 1.1	3.8 ± 0.9
Posterior piriform cortex	Distance (mm)	16.0	14.9	14.9	12.8	12.4
	Conduction delay (ms)	4.6 ± 1.3	4.1 ± 1.1	4.1 ± 1.1	3.5 ± 0.9	3.4 ± 0.8
Lateral amigdaloid nucleus	Distance (mm)	14.6	13.7	13.7	11.8	11.4
	Conduction delay (ms)	4.2 ± 1.4	3.7 ± 1.3	3.8 ± 1.2	3.2 ± 1.0	3.1 ± 0.8

Ant-l: anterior limb. Post-l: posterior limb. AC: anterior commissure.

Figures

Figure 1

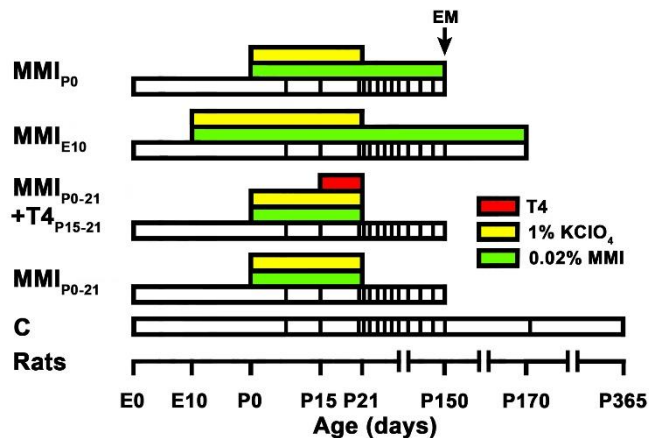


Figure 1. Experimental groups and treatments. Cartoon shows the experimental groups studied. Colour horizontal bars show different treatments, white bars show the lifespan and at the bottom is a time scale. Vertical lines within white bars show the age of *in vivo* MRI scans. Hypothyroidism was induced by 0.02% methimazole in the drinking water (MMI; green bars). T4 (red bar) was infused subcutaneously using osmotic mini-pumps (delivering ratio: 1 μ L/h/day). MMI groups were MMI-treated from the indicated age to the day of sacrifice (end of white bar). MMI_{P0-21}+T4_{P15-21} group was additionally T4-treated (red bar) from P15 to P21. All MMI pups were also treated with 1% KClO₄ (yellow bars) up to P21, in order to additionally block thyroid function during foetal and lactating periods. Four pups from 2 different litters per experimental group were sacrificed at P150 and studied for electron microscopy (EM). In all groups, last MRI scan was just before sacrifice at P150, except control (C) and MMI_{E10} rats not processed for EM that were additionally scanned at P170 and P365 (C rats) and at P170 (MMI_{E10}).

Figure 2

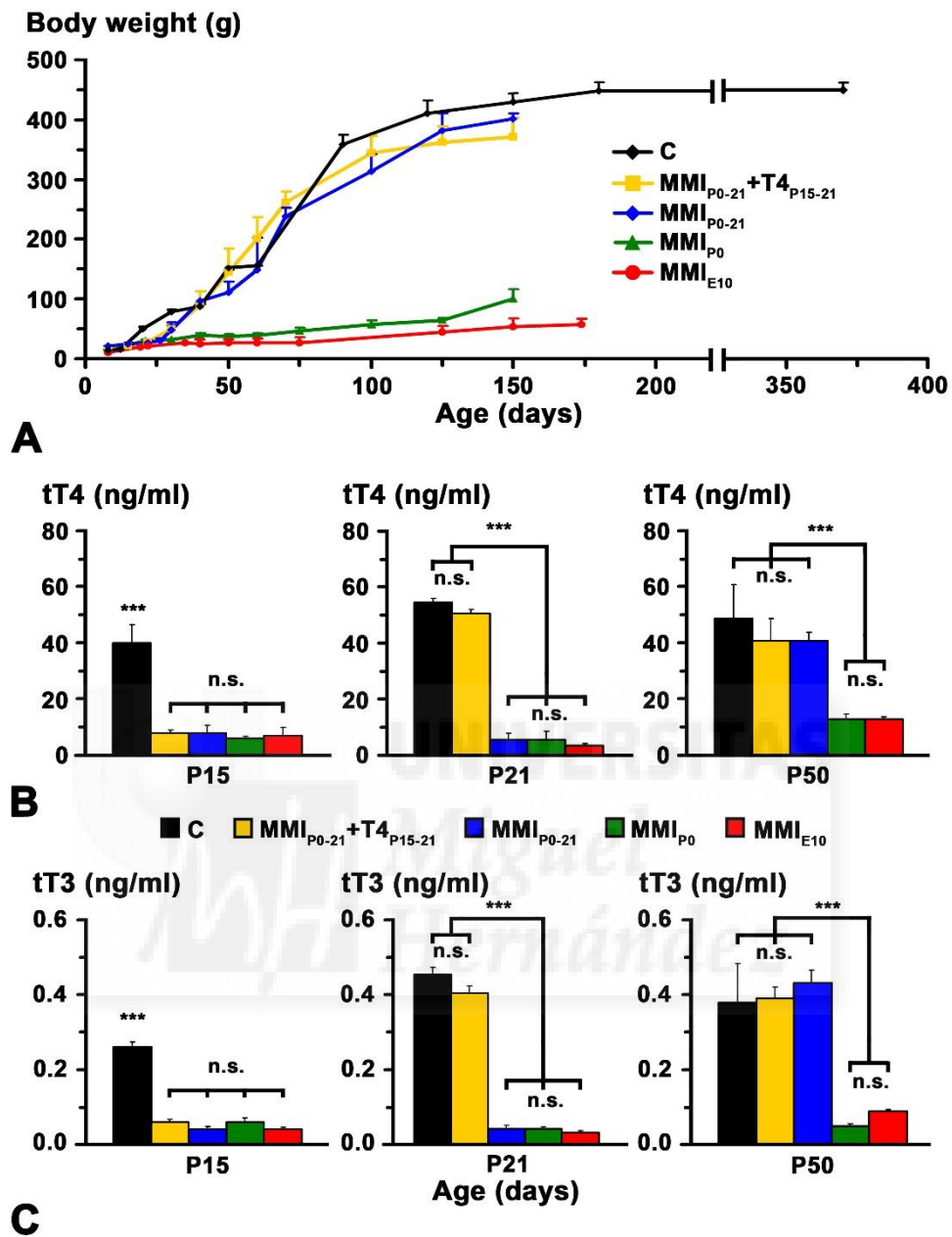


Figure 2. Body weight and plasma concentration levels of thyroid hormone (TH). Changes of body weight with age in C and MMI rats (**A**). Note the arrested growth of chronic hypothyroid pups. Bar histograms (**B,C**) show the total plasma concentrations of T4 (tT4) and T3 (tT3) at the indicated ages. TH plasma concentrations were recovered in transient hypothyroid rats at P50. Bars: mean \pm SD. n.s.: non-significant differences. Significant differences: *** $P \leq 0.001$ ($n = 8-11$ rats per group).

Figure 3

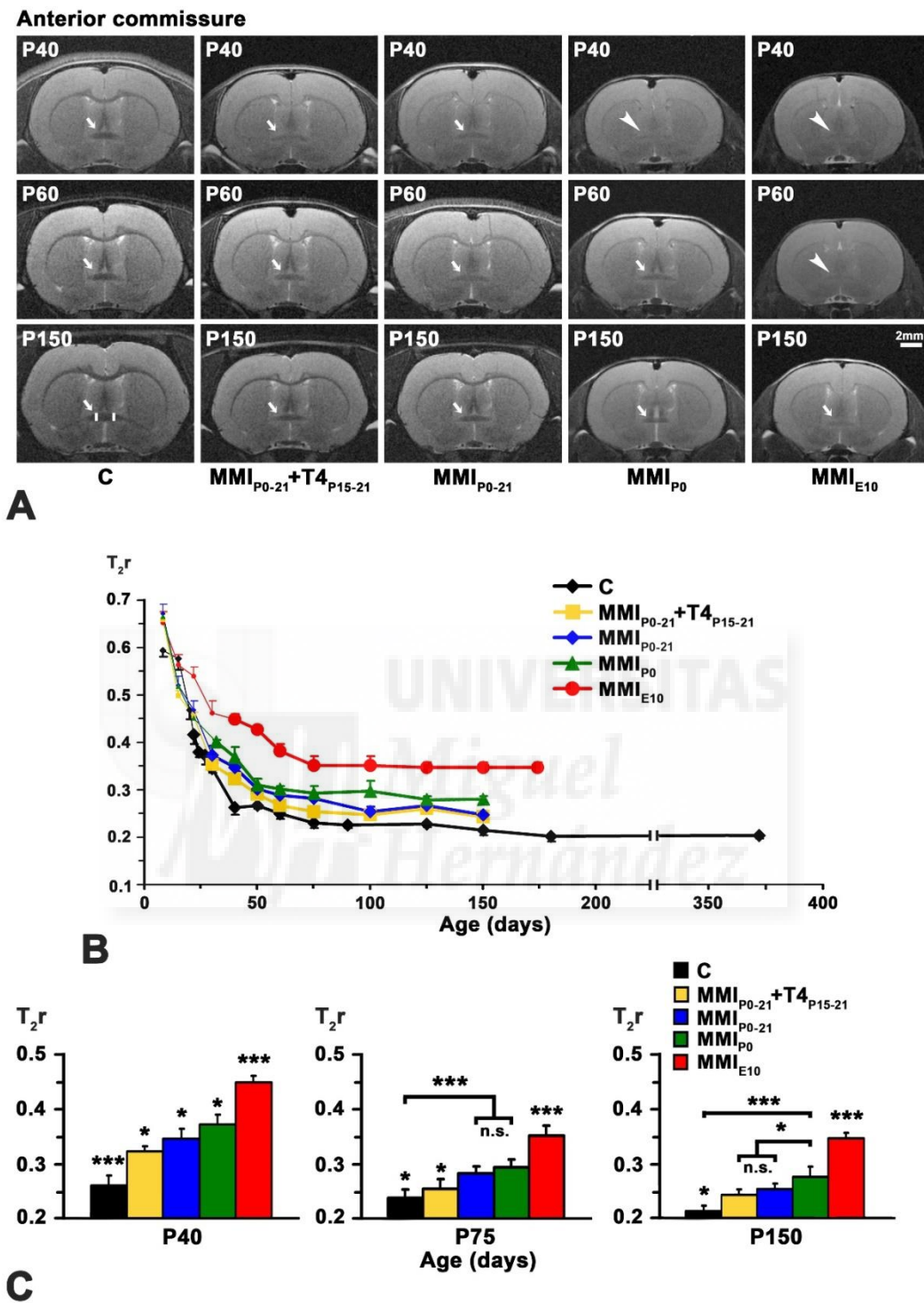


Figure 3. MRI images and T_{2r} of the AC at postnatal ages. At all ages, T2-weighted images (A) of the AC (arrows and arrowheads) of MMI rats were less contrasted than in controls (arrowheads point undistinguishable AC). It remained hardly visible in chronic hypothyroid rats at P150 (arrow). A region of interest (ROI; area between vertical white bars) of the AC is shown in P150 C rats. Changes of T_{2r} at postnatal ages (B); bold dots show T_{2r} values when AC was darker than the adjacent neuropil. In C rats, T_{2r} decreased rapidly from P8 to P50 and then more slowly. In MMI rats, T_{2r} values showed a similar trend but remained higher than in C rats. Bar histograms (C) show that at all ages, T_{2r} was significantly higher in MMI than in C rats. Bars: mean \pm SD. n.s.: non-significant differences. Significant differences: * $P \leq 0.05$ and *** $P \leq 0.001$ ($n = 8$ rats per group).

Figure 4

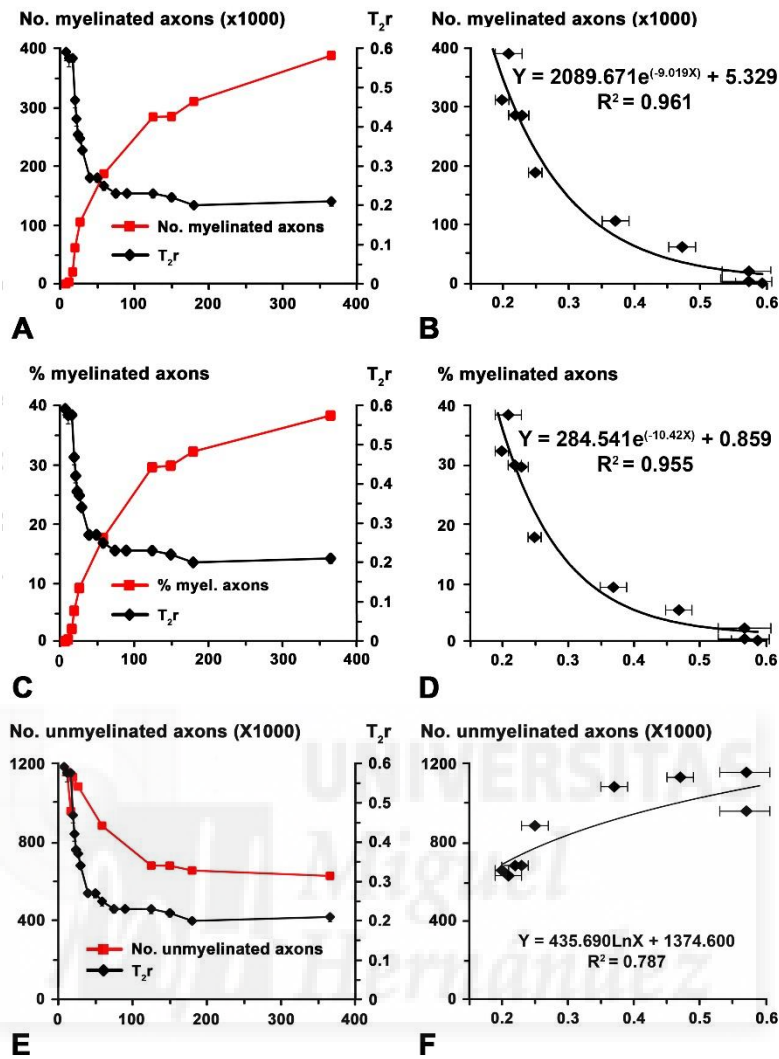


Figure 4. Correlation of T_{2r} with EM data in the AC at postnatal ages. Line charts (A,C,E,G) show myelinated axon number and percentage, unmyelinated axon number in C rats (red lines; EM data in A,C and E are from Berbel et al., 1994) and T_{2r} (black lines) at certain points of postnatal age. Regression functions (B,D,F,H) between EM data and T_{2r} . High correlations were found between T_{2r} and myelinated axon number (B; $R^2 = 0.961$) and percentage (D; $R^2 = 0.955$), while unmyelinated axon number (F; $R^2 = 0.787$) correlated poorly with T_{2r} .

Figure 5

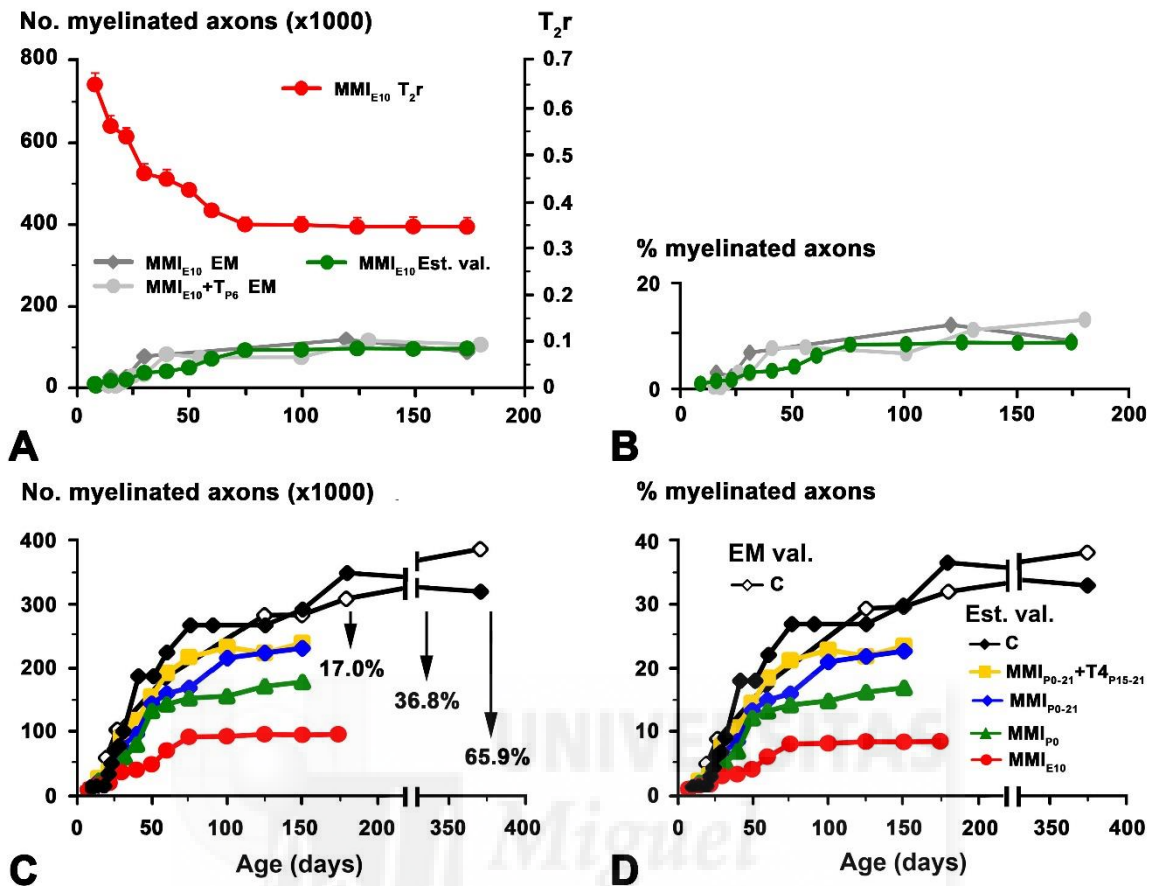


Figure 5. Estimated values for MMI treated rats. Estimated values (green dots) of myelinated axon number (A) and percentage (B) for MMI_{E10} rats obtained using regression functions shown in **Figures 4B,D**. These values were similar to those previously published in EM studies (MMI_{E10} - grey dots - and $MMI_{E10+T_{P6}}$ - dark-grey dots- groups in Berbel et al., 1994). These regression functions were used to estimate myelinated axon number (C) and percentage (D) at postnatal ages in C, transient and chronic hypothyroid rats. At P150, estimated values (Est. val.) of myelinated axon number and percentage of C rats was similar to published values (EM val.; Berbel et al., 1994). Estimated values of myelinated axon number (C) for transient hypothyroid (on average, 17%), MMI_{P0} (38.8%) and MMI_{E10} (65.9%) decreased with respect to C rats. A similar decrease was found for the estimated myelinated axon percentage (D).

Figure 6

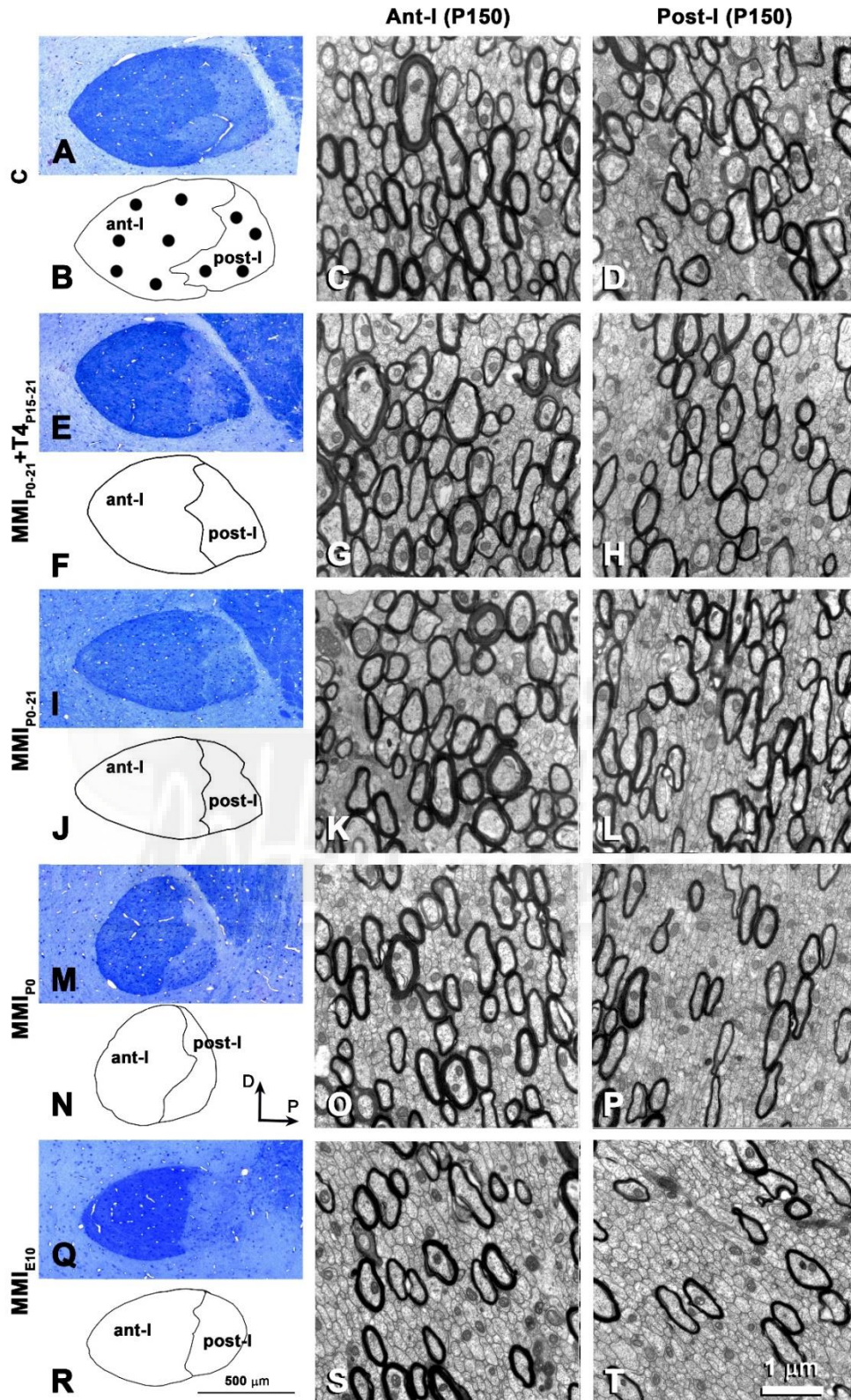


Figure 6. Optical and electron microscope (EM) structure of the AC at P150. Semi-thin sections showing the AC (**A,E,I,M,Q**). Outlines show the AC's boundaries with the neuropil and between limbs (**B,F,J,N,R**). Note the decreased midsagittal transversal AC area in MMI compared to C rats. EM images (middle and right rows) show the ultrastructure of ant-I and post-I. Note the decreased myelinated axon density in post-I compared to ant-I. In all groups, the myelin thickness was similar. Dots (**B**) show the approximate sites where EM photomicrographs were taken. Same magnification for optical (bar in **R**) and EM micrographs (bar in **T**).

Figure 7

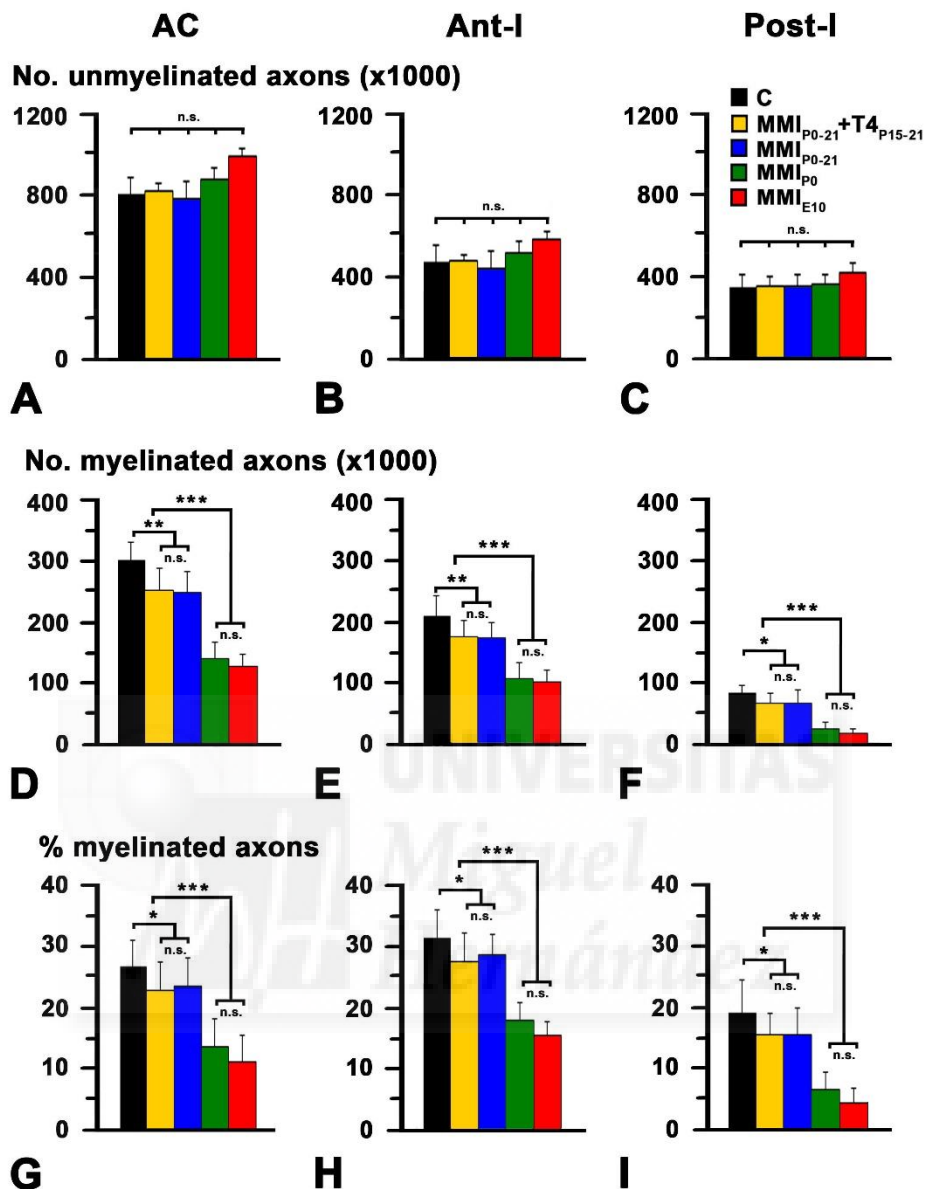


Figure 7. Electron microscope (EM) quantitative data of the AC at P150. Bar histograms show unmyelinated axon number (**A-C**), and myelinated axon number (**D-F**) and percentage (**G-I**) in AC, ant-I and post-I. The total unmyelinated axon number in AC, ant-I and post-I was similar between MMI and C rats (**A-C**). In contrast, myelinated axon number (**D-F**) and percentage (**G-I**) in AC, ant-I and post-I decreased significantly in MMI with respect to C rats. Bars: mean \pm SD. n.s.: non-significant differences. Significant differences: * $P \leq 0.05$ and *** $P \leq 0.001$ ($n = 4$ rats per group).

Figure 8

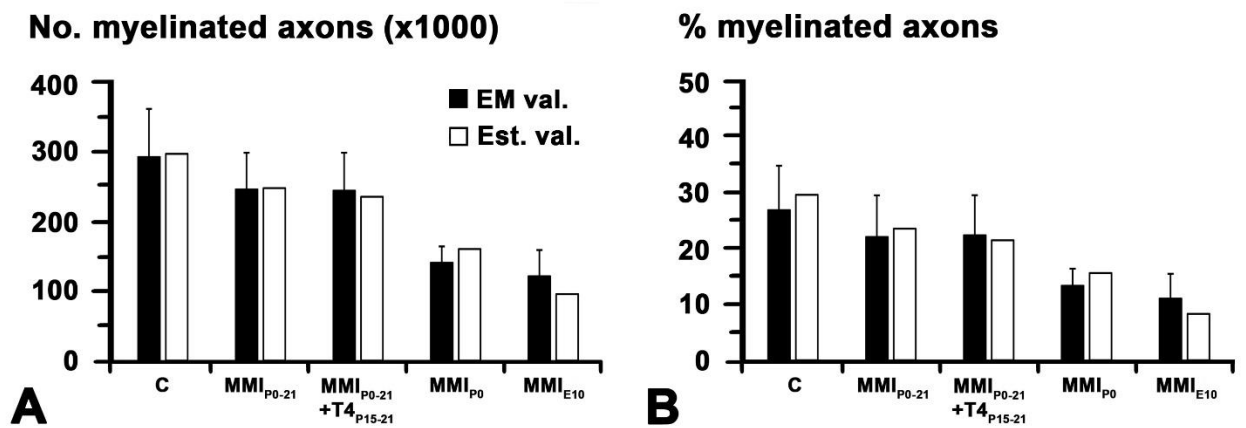


Figure 8. Comparison between T_{2r}-estimated and electron microscope (EM)-observed values. Bar histograms show EM (EM val.) and T_{2r}-estimated values (Est. val.) of myelinated axon number (A) and percentage (B). The myelinated axon number and percentage in AC was similar to that estimated using regression functions for C rats. Black bars: means \pm SD.



Figure 9

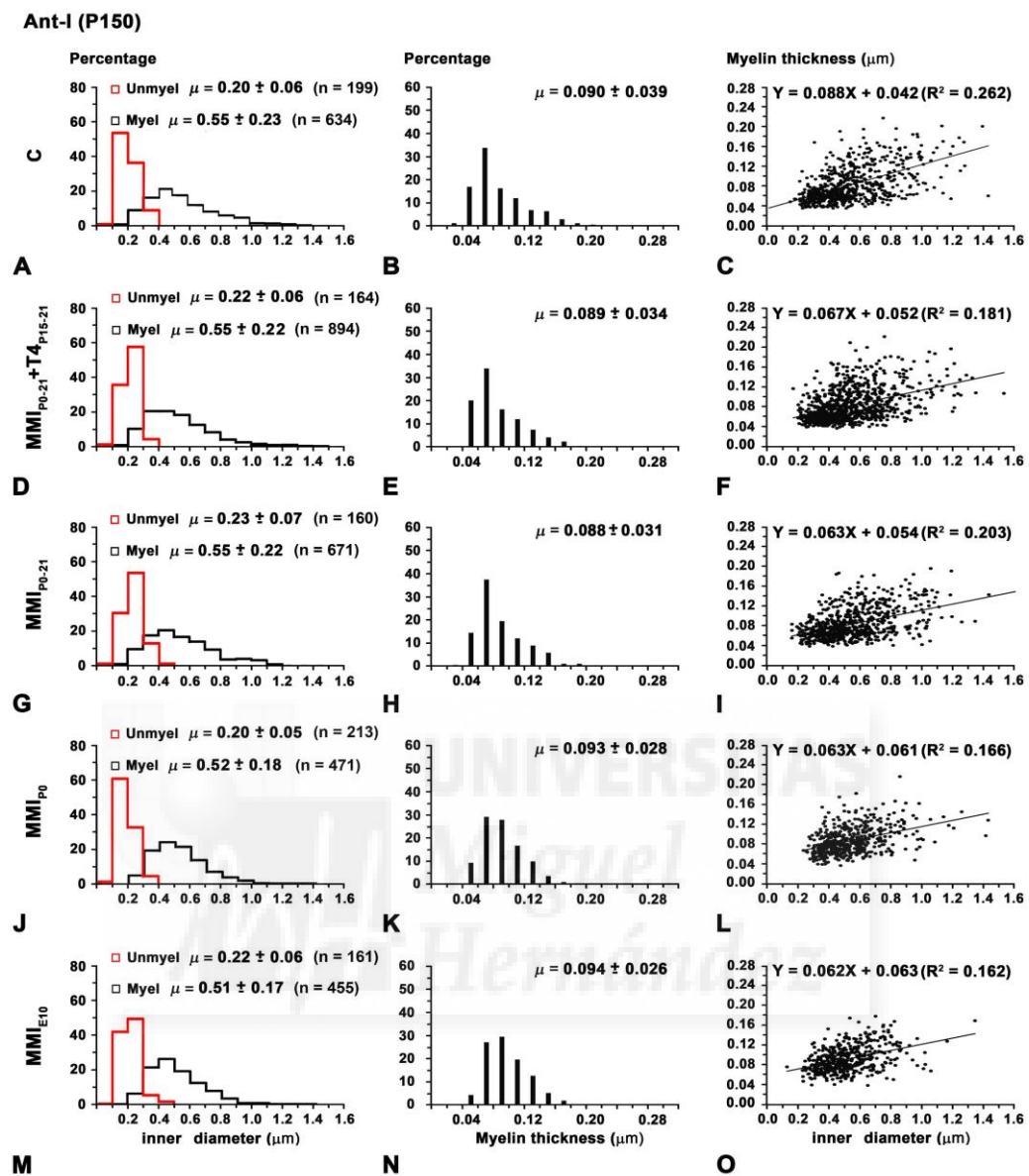


Figure 9. Distribution of myelinated axon diameter and myelin thickness in ant-I at P150. Histograms (A,D,G,J,M) show unmyelinated and myelinated axon diameter distribution in ant-I. Mean unmyelinated axon diameter was similar between MMI and C rats, while myelinated axon diameter decreased ($P < 0.05$) in chronic hypothyroid rats. Histograms (B,E,H,K,N) show myelin thickness distribution. The mean myelin thickness increased ($P < 0.05$) in chronic hypothyroid respect to transient hypothyroid and C rats. Plots (C,F,I,L,O) show the correlation between myelinated axon inner diameter and myelin thickness. Note the poor correlation found (R^2 range 0.062-0.162). Nevertheless, the slope of the regression function was higher in C (5.0 deg) than in MMI (on average, 3.6 ± 0.1 deg) rats. Correlation coefficient (R^2), number of axons (n) and means ($\mu = \text{mean} \pm \text{SD}$) are indicated.

Figure 10

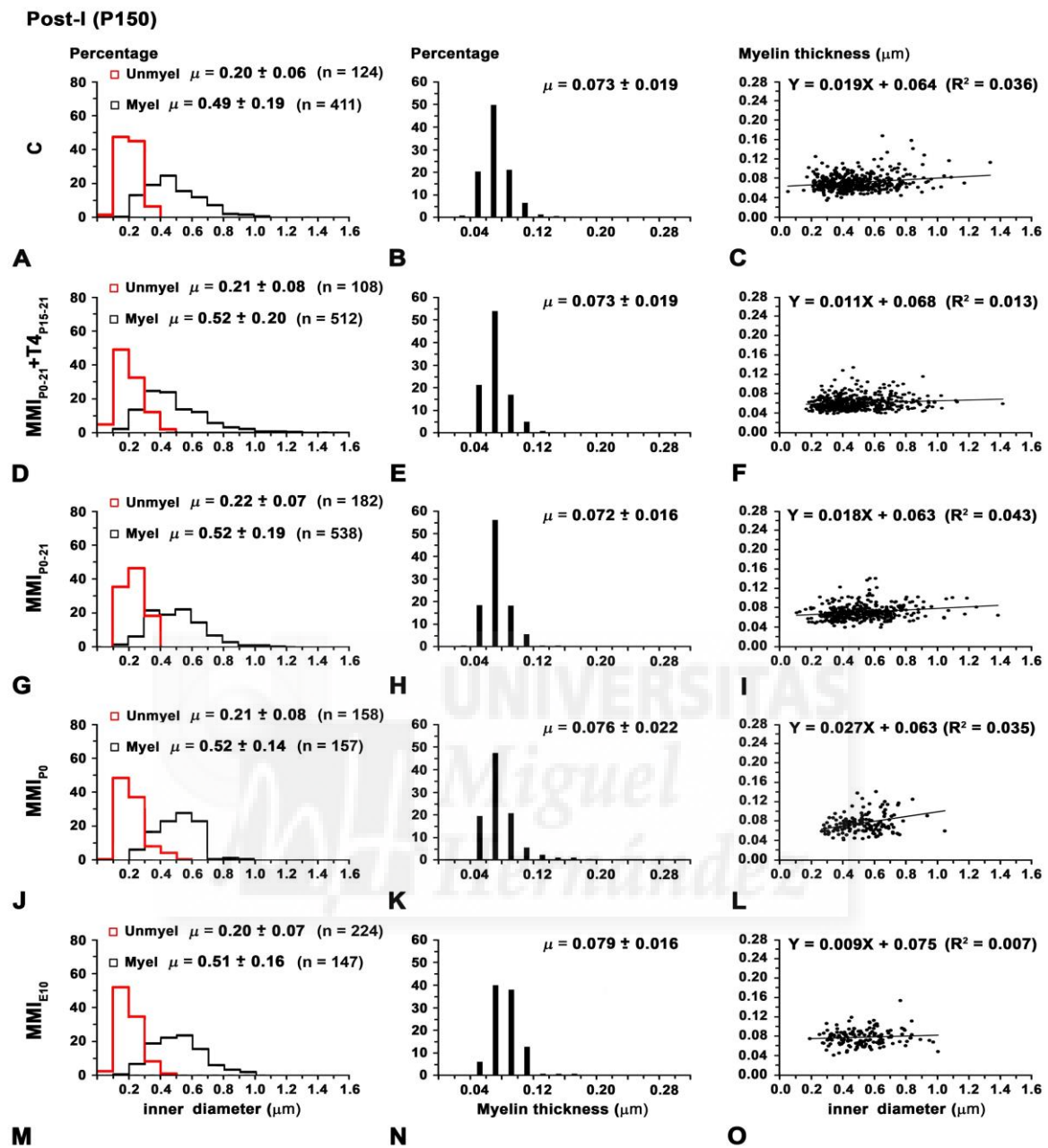


Figure 10. Distribution of myelinated axon diameter and myelin thickness in post-I at P150. Histograms (A,D,G,J,M) show unmyelinated and myelinated axon diameter distribution in post-I. Unmyelinated and myelinated axon diameter was similar between C and MMI rats. Histograms (B,E,H,K,N) show myelin thickness distribution. The mean myelin thickness increased ($P < 0.05$) in chronic hypothyroid respect to transient hypothyroid and C rats. Plots (C,F,I,L,O) show the correlation between myelinated axon inner diameter and myelin thickness. Note the poor correlation found (R^2 range 0.007-0.043). The slope of the regression function in C and MMI rats was very low (on average, 0.9 ± 0.4 deg). Correlation coefficient (R^2), number of axons (n) and means ($\mu = \text{mean} \pm \text{SD}$) are indicated.

Figure 11

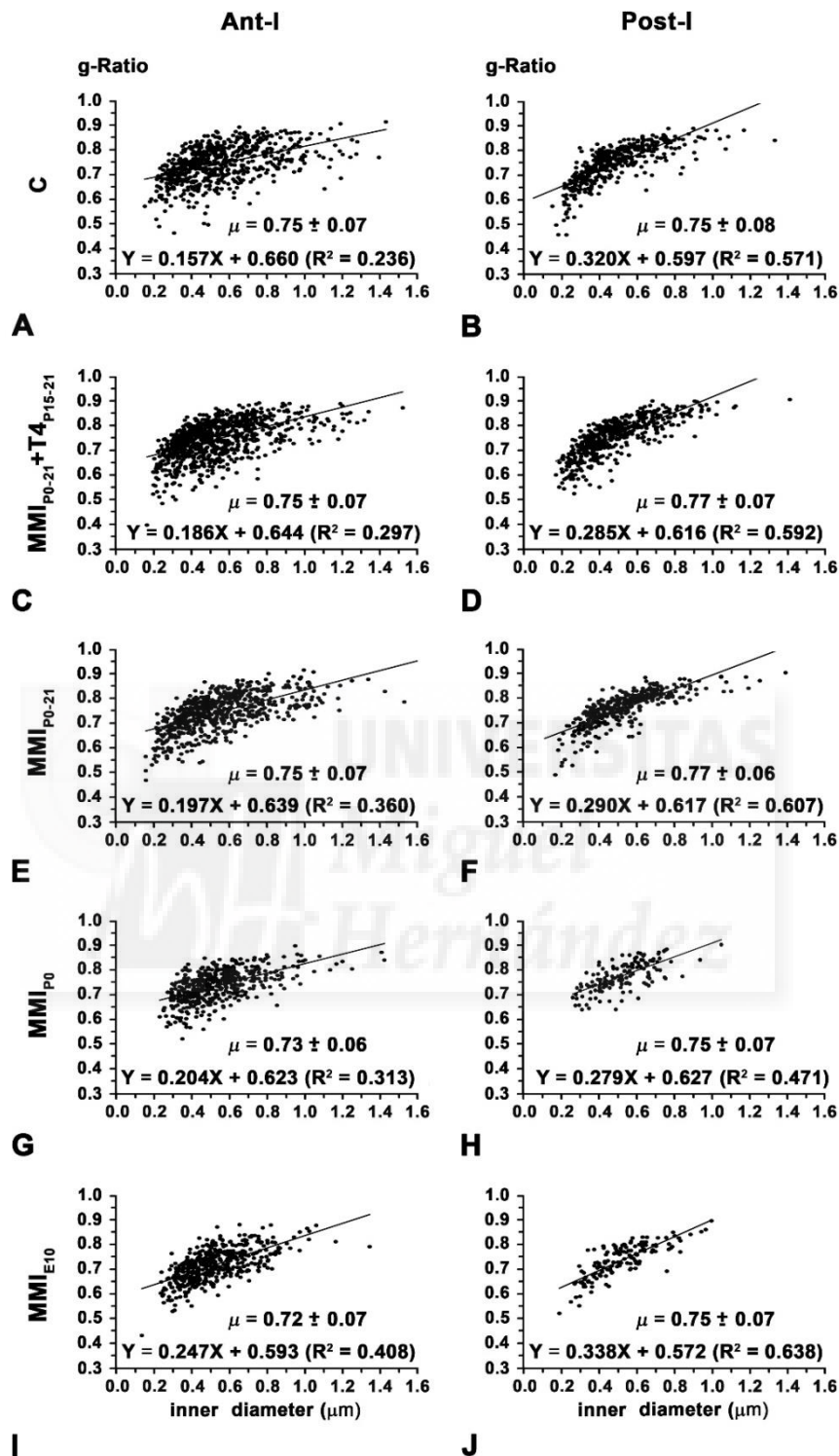


Figure 11. Correlation between g-ratio and axon diameter in ant-I and post-I at P150. Plots show the correlation between g-ratio and myelinated axon inner diameter in the ant-I (A, C, E, G, I) and post-I (B, D, F, H, J) at P150. In ant-I, g-ratio in chronic hypothyroid was lower ($P < 0.05$) than in transient and C rats, while in post-I, it was similar between MMI and C rats. g-Ratio ranged from 0.72 ± 0.07 to 0.75 ± 0.07 in the ant-I, and from 0.75 ± 0.08 to 0.77 ± 0.07 in the post-I. In the ant-I and post-I, the correlation between myelinated axon inner diameter and myelin thickness was low. Mean g-ratio ($\mu = \text{mean} \pm \text{SD}$) and the determination coefficients (R^2) are indicated.

Figure 12

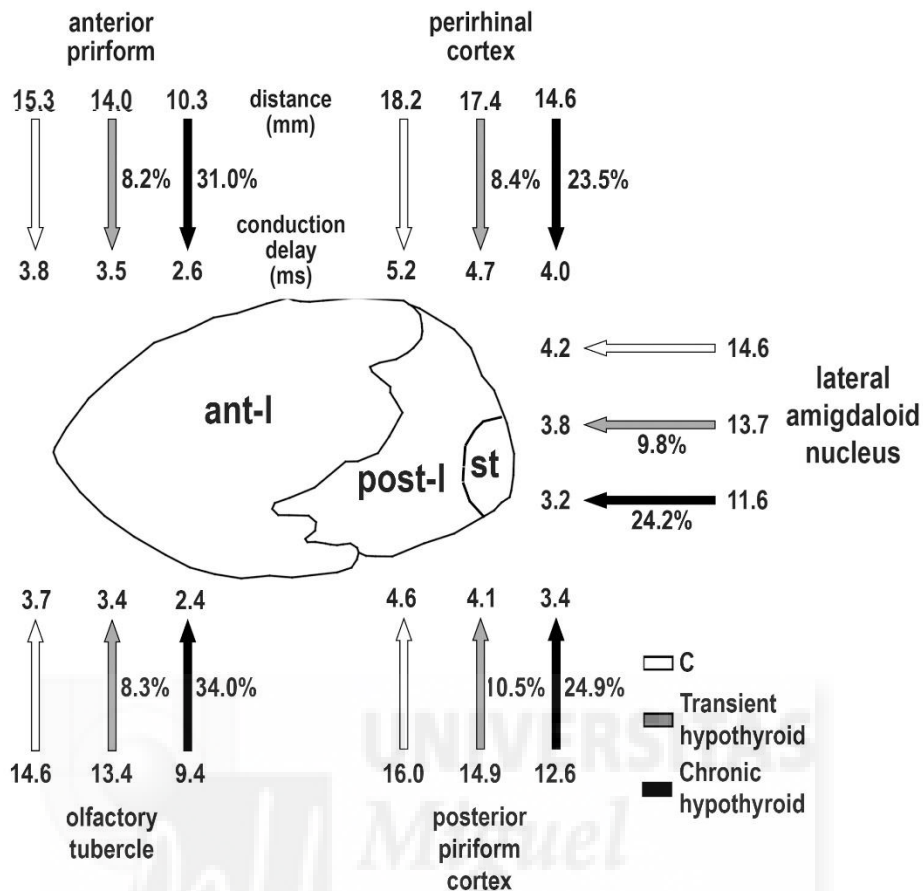
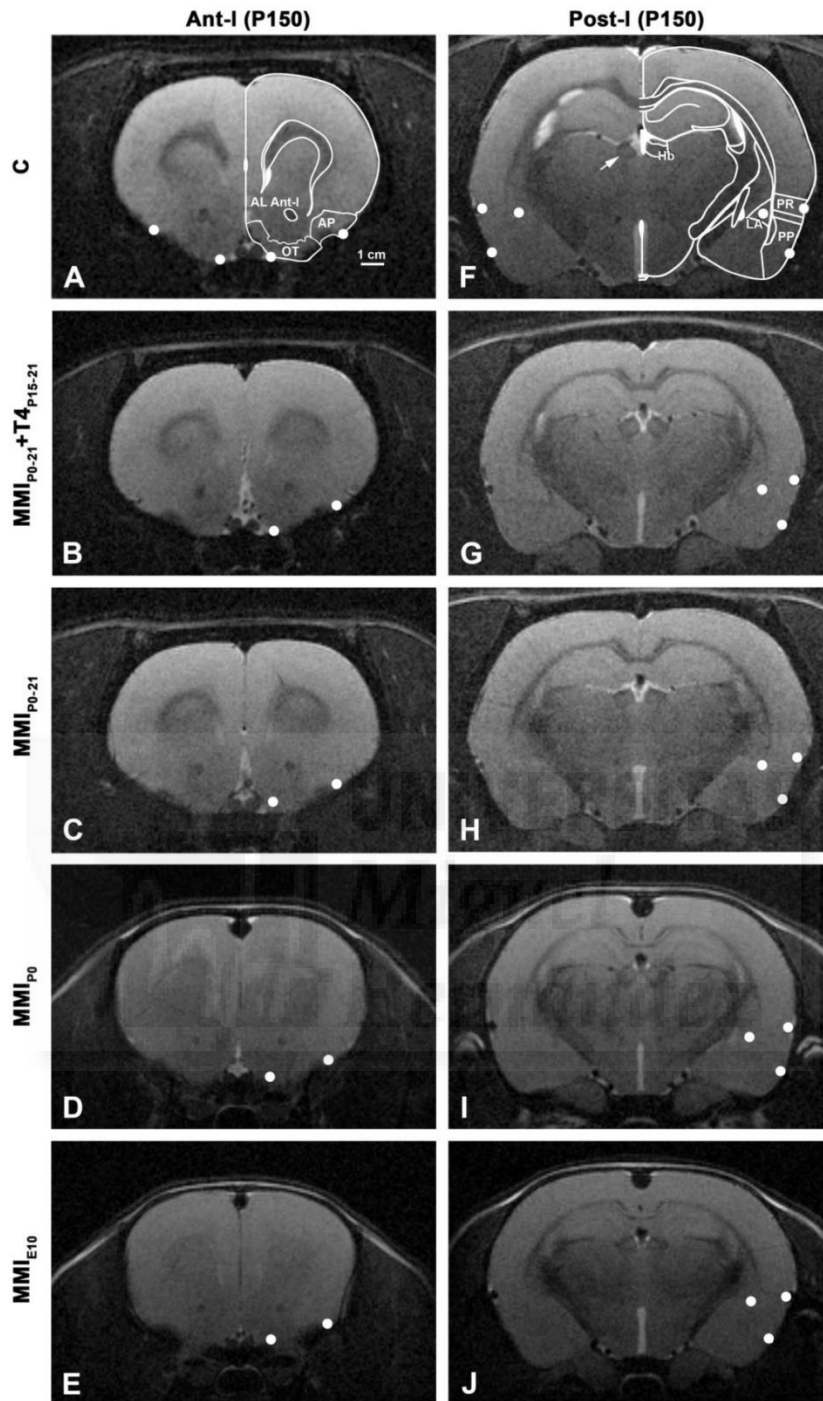


Figure 12. Conduction delay between AC connected areas. Cartoon shows main cortical and subcortical areas sending axons through ant-l (olfactory tubercle and anterior piriform cortex) and post-l (perirhinal and posterior piriform cortices, and lateral amygdaloid nucleus). The mean distance (mm) between homotopic contralateral areas (arrow-shaft end) and estimated conduction delay (ms; arrowhead) for C (white arrows), transient (grey arrow) and chronic hypothyroid (black arrows) rats are indicated. In the ant-l, conduction delay between homotopic contralateral areas decreased (arrow-shaft) in transient (on average, 8.2%) and chronic hypothyroid (on average, 32.5%) with respect to C rats. While in post-l, the average decrease was 9.5% in transient and 24.2% in chronic hypothyroid rats. A similar decrease was found in the mean distance between areas. st: stria terminalis.

Supplementary figure 1



Supplementary figure 1. MRI images showing ROIs of telencephalic areas projecting through the AC. T2-weighted images (A-J) of coronal sections of MMI and C rats at P150 show selected commissural projecting areas. Outlines (A,B) show the boundaries of the selected areas in C rats, according to Patxinos et al. (2015). At 1.89 mm from Bregma in C rats (A), the anterolateral (AL) branch of the ant-I begins to appear transversally cut. This has been taken as a landmark for MMI rats. At this level, olfactory tubercle (OT) and anterior piriform (AP) cortex can be seen in C (A) as well as in MMI (B-E) rats. At -3.36 mm from Bregma in C rats (B), the lateral and medial habenular (Hb) nuclei appear darker than the adjacent neuropil (arrow). This has been taken as a landmark for MMI rats. At this level, the perirhinal (PR) and posterior piriform (PP) cortices and lateral amygdaloid (LA) nucleus can be seen in C (F) as well as in MMI (G-J) rats. Contralateral distances were measured between homotopic regions of interest (ROIs; dots) located at mid-zones of pial surfaces of selected areas and the central zones of LA. Same scale for all figures.

Supplementary Table 1. Total thyroid hormone concentration in plasma.

Age (days)	C	MMIP0-21 +T4P15-21	MMIP0-21	MMI _{P0}	MMI _{E10}
tT4 (ng/ml)					
P15	40.1 ± 5.8	7.8 ± 0.4	8.2 ± 1.0	5.9 ± 0.1	6.9 ± 1.0
P21	54.9 ± 3.5	50.9 ± 2.6	5.9 ± 1.5	5.6 ± 2.7	4.3 ± 0.1
P50	49.0 ± 12.5	41.3 ± 7.8	41.2 ± 3.4	12.7 ± 2.5	13 ± 0.5
tT3 (ng/ml)					
P15	0.26 ± 0.03	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.06 ± 0.05	0.04 ± 0.01
P21	0.46 ± 0.05	0.40 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
P50	<u>0.38 ± 0.10</u>	<u>0.39 ± 0.06</u>	<u>0.42 ± 0.07</u>	<u>0.05 ± 0.02</u>	<u>0.09 ± 0.01</u>

Data are mean ± SD (n = 6).

Supplementary Table 2. T_{2r} values in the AC at different posnatal ages.

Age (days)	C	MMIP0-21 +T4P15-21	MMIP0-21	MMI _{P0}	MMI _{E10}
P8	0.59 ± 0.01 ^a	0.66 ± 0.02 ^a	0.67 ± 0.02 ^a	0.66 ± 0.02 ^a	0.65 ± 0.02 ^a
P15	0.57 ± 0.02 ^a	0.50 ± 0.01 ^a	0.52 ± 0.02 ^a	0.52 ± 0.03 ^a	0.56 ± 0.02 ^a
P20	0.47 ± 0.02 ^b				
P22	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.01 ^b	0.47 ± 0.02 ^b	0.45 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.02 ^b
P24	0.38 ± 0.01				
P27	0.37 ± 0.02				
P30	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.01 ^c	0.46 ± 0.02 ^b
P40	0.26 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.37 ± 0.02 ^c	0.44 ± 0.01 ^c
P50	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01 ^c	0.43 ± 0.01 ^c
P60	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.38 ± 0.02 ^c
P75	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.35 ± 0.02
P100	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.35 ± 0.02
P125	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.35 ± 0.01
P150	0.22 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.35 ± 0.01
P180	0.20 ± 0.01				0.35 ± 0.01
P365	0.21 ± 0.01				

Values are mean ± SD (n = 8). ^a: the AC is lightly than the adjacent neuropil. ^b: the AC has a similar contrast than the adjacent neuropil. ^c: the AC is lightly darker than the adjacent neuropil. The remaining values correspond to AC darker than the adjacent neuropil.