

91



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH) en la Ansiedad. Estudio preliminar a partir del modelo de *Enterramiento Defensivo*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A
MARIANA GUTIÉRREZ MARISCAL



DIRECTOR DE TESIS DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DRA. PATRICIA DE GORTARI GALLARDO



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

2002

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AYUTLA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Participación de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) en la Ansiedad. Estudio Preliminar a partir del Modelo de Enterramiento Defensivo realizado por Mariana Gutiérrez Mariscal

con número de cuenta 9100245-7 , quién cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Patricia de Gortari Gallardo

Patricia de Gortari Gallardo

Propietario Dra. Carolina López Rubalcava

Carolina López Rubalcava

Propietario Biol. Julio Prieto Sagredo

Suplente Dra. Patricia Joseph Bravo

Patricia Joseph Bravo

Suplente M. en I.B.B. Saúl Cano Colín

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de BIOLOGIA

Dr. Eberto Novelo Maldonado

DR. EBERTO NOVELO MALDONADO



DEPARTAMENTO

**“Participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH)
en la Ansiedad. Estudio preliminar a partir del modelo de
Enterramiento Defensivo”**

**Mariana Gutiérrez Mariscal
Facultad de Ciencias
UNAM**

A mis papás.

Pablo Pedro Gutiérrez Bardales y

Giua Mariscal O' Connor.

con todo mi amor.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la UNAM, por todo lo que me ha dado, desde siempre.

En particular, quiero agradecer el apoyo incondicional de todos los compañeros del laboratorio de Neurobiología del Instituto de Biotecnología, especialmente a Argel y Arlene, por los gozos y sufrimientos compartidos. Sin el consejo, paciencia y enseñanzas de Miguel Cisneros y Fidelia Romero, este trabajo no hubiera sido posible, muchas gracias.

Mi más cariñoso agradecimiento a mis asesoras, Patricia de Gortari y Patricia Joseph por su apoyo, guía, consejo y sobre todo, por compartir conmigo su amor a la investigación.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz.

A la Dra. Carolina López, por su apoyo durante la elaboración de este trabajo en particular, por las facilidades otorgadas para la realización del modelo animal en el CINVESTAV, del Instituto Politécnico Nacional.

A mis queridos profesores de la carrera: Saúl Cano, Julio Prieto, Irene Pisanty y Jorge Meave por sus enseñanzas y porque gracias a personas como ellos, esta universidad es grande.

A toda mi familia: a mi Jefita por su fuerza y apoyo, gracias por darnos el ejemplo. A mis tios Ricardo, Tonio (y Rosa), Rosanna (y Miguel) y a Vale. A mis primos, Juan - Valeria, mi sobrinita!! , Ana, Pedro, Daniela, Rosana, Miguel Angel y Sergio, siempre me ha parecido normal tenerlos tan cerca de mi, pero es en realidad un gran

privilegio. A mis papás por su amor, ejemplo, apoyo, cariño...uff! por todo!. A mi hermana, Lilita porque no sé que haría sin ti!!!

A mis amigos de la facultad: A Diego, por tantos momentos felices que compartimos. A Alonso, por amenizar tantos momentos, por las experiencias compartidas. A Lak, porque de una manera u otra, siempre encontramos la brújula, sé que estás ahí, gracias. A la gente con la que compartí clases, fiestas, prácticas, en especial a los del Taller.

A Tuchick, Mary, Juan Manuel, Rolando y Rebeca, por tantos años, tantas risas y por su apoyo incondicional.

A Gabo, por compartir los combos "especiales" en el cine y todo lo que eso implica. A Barbara, Isabel y Lorenza, gracias chicas.

A Emilio Caballero por ser tan bueno, porque siempre puedo contar contigo.

A las chicas del atlántico: Marina, Lila, Gabi, Vicky y a Mir, por todos los ánimos y porque aunque estemos tan lejos, siempre están conmigo.

Agradezco el apoyo financiero otorgado por la DGAPA.

INDICE

Capítulo		Página
	Resumen	1
I	Introducción	2
II	Justificación	27
III	Hipótesis	28
IV	Objetivos	29
V	Materiales y Métodos	30
VI	Resultados	39
VII	Discusión	52
VIII	Conclusión	58
IX	Perspectivas	59
X	Anexos I y II	60
XI	Referencias	65

RESUMEN

En este trabajo se investiga la participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH) en la ansiedad (cepa de ratas Wistar) por medio del modelo animal denominado "Enterramiento Defensivo". La TRH se origina a partir de una proteína de alto peso molecular (Pro-TRH) que es procesada enzimáticamente, al ser secretada desde la eminencia media del hipotálamo hacia la adenohipófisis por medio del sistema porta, estimula la secreción de la Hormona Estimuladora de la Tiroides (TSH) iniciando así, la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Además de su actividad neuroendocrina, se ha reportado su participación en funciones de alerta, supresión de estados narcóticos inducidos por sustancias de abuso, como antidepressivo, entre otras funciones. La TRH se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central de los mamíferos, interactúa con vías de neurotransmisión como por ejemplo, la GABAérgica, la serotoninérgica y la noradrenérgica. La ansiedad es un fenómeno emocional humano, sin embargo, por medio de modelos animales es posible provocar estados de alerta y estrés que permitan estudiar sus bases fisiológicas. En este trabajo se utilizó una prueba conductual (Modelo de ansiedad de enterramiento defensivo) y análisis bioquímicos (RIA y RT-PCR), con el objetivo de cuantificar la concentración de TRH y de su RNA mensajero en regiones del sistema límbico involucradas en la ansiedad. Además se cuantificó, por RIA, la concentración de corticosterona sérica como medida de estrés. Se trabajó con cinco grupos de ocho ratas: a) CB o control basal, que fue habituado a la caja y cuarto de experimentación por dos días y sacrificado al tercero; b) CE 30 y CE 60, controles experimentales sacrificados 30 y 60 min después de la tercera habituación y c) E 30 y E 60, experimentales sometidos a la prueba de ansiedad en el tercer día. La prueba consistió en una caja de acrílico cubierta, en el fondo, por aserrín y con un electrodo insertado a través de una de las paredes: al ser tocado por el animal, liberaba una descarga eléctrica de 0.3mA., la reacción típica es la de ocultar el electrodo con el aserrín lo que se denomina conducta de enterramiento defensivo y es el parámetro conductual que indica ansiedad: a mayor tiempo de enterramiento, mayor ansiedad. Las regiones estudiadas fueron: hipotálamo, amígdala, núcleo accumbens, corteza frontal, hipocampo y septum. Se encontraron cambios en contenido de TRH y niveles de su RNAm en hipotálamo y amígdala que se debieron a la ansiedad específicamente. El contenido de TRH en el septum disminuyó en uno de los grupos sometidos a la prueba conductual. Los cambios encontrados en el hipocampo, corteza y núcleo accumbens no fueron exclusivos de los animales que fueron introducidos a la caja con electrodo. Estos resultados aportan evidencias de la participación de la TRH del hipotálamo y amígdala en la ansiedad producida por el modelo de enterramiento defensivo y apoyan la participación de este neuropéptido como modulador en el sistema límbico.

I. INTRODUCCIÓN

HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA, TRH

El tripéptido pyroGlu-His-Pro-NH₂ originalmente aislado del hipotálamo de mamífero, fue el primer péptido hipofisiotrópico caracterizado [Boler *et al.*, 1969; Burgus *et al.*, 1969]. Se le nombró hormona liberadora de tirotropina (TRH por sus siglas en inglés) debido a su capacidad de estimular la síntesis y liberación de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) [Heisenlender *et al.*, 1992]. La figura 1 muestra la estructura química de este péptido.

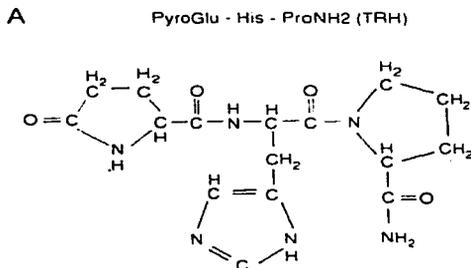


Figura 1. Estructura química de la Hormona Liberadora de Tirotropina. [Tomado de Zigmond *et al.*, 1999].

La TRH hipofisiotrópica se sintetiza en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, se libera en la eminencia media y se transporta, a través del sistema porta, a la hipófisis anterior (adenohipófisis) en donde se une específicamente al receptor TRH-R1 [Boler *et al.*, 1969] estimulando la secreción de tirotropina (tirótopos) y de prolactina (lactótopos). La regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo se ilustra en la figura 2. Participa también en la liberación de otras hormonas en la adenohipófisis, como son la hormona del crecimiento (GH) -sobre todo en condiciones patológicas-; la vasopresina y la insulina [Nilni y Sevarino, 1999; Zigmond *et al.*, 1999]. La TRH tiene

funciones neurales y endócrinas; se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central (SNC), así como en la próstata y gónadas.

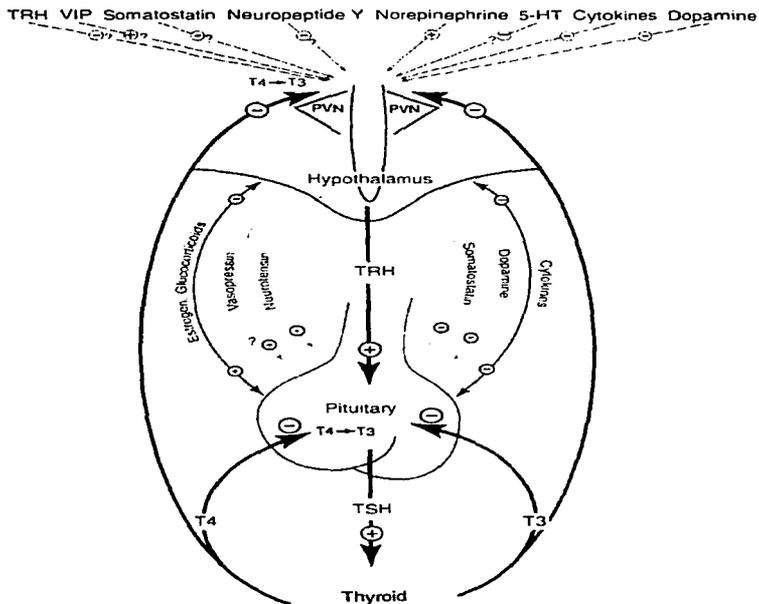


Figura 2. Regulación de eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo. La TRH es liberada del hipotálamo y en la hipófisis provoca la liberación de TSH. Ésta estimula la producción y liberación de hormonas tiroideas que a su vez, regulan negativamente al hipotálamo y a la hipófisis. Se muestran efectores que actúan inhibiendo o estimulando el eje al nivel del hipotálamo y de la hipófisis. [Tomada de Zigmond *et al.*, 1999].

El gen de la TRH se ha caracterizado tanto en el humano [Yamada *et al.*, 1986] como en la rata [Lee *et al.*, 1988] con una homología del 73.3% y del 89.2% en la región que codifica para la TRH. La unidad transcripcional de ambos genes contiene tres exones separados por dos intrones. La región 5' contiene la región promotora con gran cantidad de elementos reguladores: para el receptor de la hormona tiroidea (TR), dos unidades sencillas de regiones que unen TR en su forma monomérica y una tercera que une tanto TR homodimérica como heterodimérica con proteínas auxiliares de TR; un sitio consenso del receptor (GR) de glucocorticoides (GC); y dos elementos imperfectos de respuesta a AMPc (CREs). El exon 1 codifica para la región 5' no traducida; exon 2, para el péptido señal y para una porción corta del péptido amino terminal y en su mayor parte, el Pro-TRH se encuentra codificado en el tercer exón [Lee *et al.*, 1988]. El Pro-TRH es la molécula precursora de la TRH, es procesado enzimáticamente por peptidasas en una serie de pasos que incluyen la conversión de TRH-gly a TRH, reacción en la que participa la enzima PAM. Además de TRH, el Pro-TRH puede originar al menos otros 7 péptidos que pueden también ser secretados y transportados como la propia TRH.

Receptores específicos para la TRH (TRH-R1 y TRH-R2).

El receptor TRH-R1 se encuentra en altas concentraciones en la adenohipófisis y, predominantemente, en regiones neuroendócrinas del cerebro (e.g., núcleos paraventricular, arqueado y anterior del hipotálamo), el sistema nervioso autónomo, así como en regiones viscerales del tallo cerebral. En contraste, el receptor TRH-R2 no es detectable en la hipófisis pero se encuentra fuertemente expresado en áreas cerebrales que son importantes para la transmisión de señales somatosensoriales, de memoria, cognición, emociones, entre otras (e.g., complejo amigdalino basolateral, septum, hipocampo -*subiculum*- y regiones corticales) [Heuer *et al.*, 2000].

Piroglutamil peptidasa II (PPII).

La PPII es una metalopeptidasa de especificidad restringida que hidroliza el enlace peptídico piroglutamil-histidil de la TRH. Es una proteína integral de membrana con un dominio intracelular pequeño, un segmento transmembranal y un dominio extracelular grande. Se encuentra en grandes cantidades en el cerebro, específicamente presente en células neuronales; su inhibición incrementa la recuperación de los niveles de TRH liberada *in vitro*. Estudios de hibridación *in situ* demuestran que su RNAm colocaliza

con el RNAm del receptor TRH-R1 en varias regiones cerebrales. Por lo anterior, se ha propuesto como la principal vía de inactivación de la TRH extracelular [Charti *et al.*, 1994]. La actividad de la PPII es regulada positivamente por hormonas tiroideas y negativamente por estrógenos [Bauer, 1988] que actúan directamente en la adenohipófisis; la TRH, a través de la activación de su receptor TRH-R1, inhibe tanto la actividad de la PPII como los niveles de RNAm [Vargas *et al.*, 1994].

Localización en el SNC.

Su sitio principal de síntesis son las neuronas que se originan en la porción medial parvocelular del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) [Strand, 1999.] y que liberan a la TRH en la eminencia media del hipotálamo, en donde se concentra un tercio de la TRH del SNC. Sin embargo, la TRH se encuentra ampliamente distribuida en el SNC, pues dos terceras partes del contenido cerebral total de este neuropéptido se encuentran localizadas fuera del hipotálamo [Toni y Lechan, 1990; Nillni y Sevarino, 1999]. Lechan (1986) reportó la presencia de RNAm de TRH en densidades máximas (además de en el hipotálamo) en el bulbo olfatorio, núcleo *caudado-putamen*, núcleo talámico reticular y en el tallo cerebral (*Rafé obscurus/magnus* y núcleo trigeminal espinal) mientras que en hipocampo (giro dentado y *subiculum*), amígdala (lateral y basolateral), corteza (piriforme) y núcleo accumbens, en densidades moderadas.

Métodos de microdissección, radioinmunoensayo (RIA) y conteo de células inmunoreactivas (ICC) detectan pericaria positiva para TRH en hipocampo (CA2, CA3 y capa molecular); amígdala (núcleos medial y central) y fibras de TRH en núcleo accumbens, amígdala (mismos núcleos) hipocampo (*stratum oriens*), septum, corteza piriforme, *locus coeruleus* y núcleos de Rafé, entre otras regiones. Las neuronas TRHérgicas del hipotálamo lateral, del grupo perifornical y del área lateral preóptica, proyectan al *septum*. Usando antisuero que reconoce el proTRH, se han encontrado células inmunorreactivas en la materia gris periacueductal [Toni y Lechan, 1990; Nillni y Sevarino, 1999].

Acciones extra hipofisiotrópicas.

En el sistema nervioso central la TRH actúa como neurotransmisor y como neuromodulador, produciendo una amplia gama de efectos en el comportamiento que son mediados independientemente de su periférica tiroidea [O'Leary y O'Connor,

1995). La TRH en el SNC es, en muchos sentidos, un activador neuronal [Metcalf y Dettmar, 1981]; cuando es administrada sistémica o centralmente, aumenta el tiempo de vigilia [Arnold *et al.*, 1991; Nishino *et al.*, 1997] disminuye el tiempo de la narcosis inducida por β -endorfinas [Tache *et al.*, 1977], tetrahidrocanabinol [Bhargava y Matwyshyn, 1980], benzodiazepinas [Glue *et al.*, 1992], barbitúricos [Sharp *et al.*, 1984, Hashimoto *et al.*, 1993] y por etanol, así como los efectos hipotérmicos causados por éste [Breese *et al.*, 1974; French *et al.*, 1993] en múltiples especies. Provoca mejorías en medidas conductuales de memoria y aprendizaje en donde los sistemas colinérgico y noradrenérgico parecen estar involucrados, siendo la TRH un facilitador de estas vías [Kasparov y Chizh, 1992; Itoh *et al.*, 1994 y Ogasawara *et al.*, 1996]. Promueve la activación del sistema locomotor, cuando es inyectado al núcleo accumbens [Sharp *et al.*, 1984; Miyamoto y Nagawa, 1987], área ventral tegmental, caudado, núcleos septales [Sharp *et al.*, 1985] o al hipotálamo ventromedial [Shian *et al.*, 1985]. Se ha propuesto que estos efectos son principalmente mediados por el sistema dopaminérgico [Miyamoto y Nagawa, 1987]. Se ha observado que la TRH tiene efectos antidepresivos independientes de los efectos sobre la TSH o las hormonas tiroideas [Sattin, 1987]. Durante la terapia con choques convulsivos, la TRH aumenta en la amígdala lo que ha planteado la posibilidad de que este neuropéptido pueda contribuir a la recuperación de la depresión.

La actividad epileptogénica en el hipocampo -inducida ya sea química o eléctricamente (por estimulación de la amígdala)- tiene efectos sobre la vía TRHérgica. La estimulación eléctrica o química de la amígdala basolateral (BLA) produce aumento del contenido de TRH en zonas epileptogénicas [Rosen *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 1994 de Gortari *et al.*, 1998]. Algunos análogos tienen efectos anticonvulsivos dependientes de la dosis y han sido usados terapéuticamente con éxito [Inanaga *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1995] por lo que se ha propuesto que la TRH puede modular la actividad convulsiva y participar en la patofisiología de la epilepsia. La TRH tiene efectos antinociceptivos, aunque su actividad como un modulador endógeno del dolor ha sido controversial, si bien su presencia en núcleos que componen este sistema ha propiciado la teoría de que el neuropéptido o algún derivado pueden actuar a múltiples niveles en su modulación [Lechan y Toni, 1992].

TRH y otros sistemas de neurotransmisión

Las neuronas TRHérgicas en el NPV están localizadas de tal manera que son susceptibles a regulación neurendócrina. Son densamente innervadas por axones que contienen noradrenalina (NA) y adrenalina (A) (-que se originan en la médula y puente-) que estimulan la secreción de TRH. En contraste, las proyecciones noradrenérgicas provenientes del *locus coeruleus* parecen ser inhibitorias. También son innervadas por neuronas que liberan neuropéptido Y (NPY) y en menor cantidad terminales de somatostatina (SRIF) y péptidos opioides, todas estas señales afectan *in vivo* los niveles de RNAm de prepro-TRH [Heuer *et al.*, 2000]. La TRH colocaliza con substancia P (SP) y con serotonina (5-HT) en la médula espinal, sin embargo, estos sistemas neuronales son poco entendidos. El NPV recibe gran cantidad de estímulos dopaminérgicos que parecen inhibir la secreción de TRH (principalmente al nivel de la eminencia media). Los glucocorticoides y los estrógenos tienen efectos inhibitorios sobre la síntesis de TRH en el NPV, mientras que la TRH extrahipotalámica parece no ser afectada por los cambios en el eje adrenal [Kakucska y Lechan, 1995]. La inyección sistémica de TRH aumenta la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens [Heal *et al.*, 1981]; este péptido aumenta también la actividad de la vía colinérgica en los sistemas septo-hipocampal y núcleo basal-cortical [Giovannini *et al.*, 1991]. Existen evidencias de que la TRH activa la vía GABAérgica y de que compete con el sitio de unión a las benzodiazepinas en el receptor ionotrópico GABA_A.

ANSIEDAD

La ansiedad es un fenómeno humano emocional común que ocurre en respuesta a estresantes psicológicos o ambientales. Es una respuesta normal del organismo ante una amenaza: puede ser adaptativa ya que permite el establecimiento de un estado de alerta ó patológica al presentarse ante un estímulo que no es ni nocivo ni amenazante, o sin causa alguna [Clement y Chapoutihier, 1998; Sullivan *et al.*, 1998]. Dentro de la ansiedad patológica se definen los siguientes tipos de acuerdo con el Manual Estadístico y Diagnóstico 4ª Edición [DSM-IV del American Psychiatric Association]:

ANSIEDAD:

I. Fobias:

- a) Agorafobia
- b) Pánico con Agorafobia

- c) Fobia Social
- d) Fobia Simple

II. Estado de Ansiedad:

- a) Trastorno de pánico
- b) Trastorno Ansiedad Generalizada
- c) Trastorno Obsesivo Compulsivo

III. Estrés Postraumático.

[Clement y Chapouthier, 1998]

De manera breve, las fobias se definen como temores reconocibles irracionales a un objeto o situación particular. Una respuesta de tipo fóbica incluye angustia significativa y un deseo extremo de evitar el objeto o situación aversiva [Goddard y Charney, 1997]. Los estados de ansiedad presentan síntomas relativamente continuos que duran por lo menos un mes. Estos incluyen, tensión motora, hiperactividad autonómica, expectativas aprehensivas y vigilia. [Weiss y Uhde, 1990]. El estrés postraumático es un tipo de ansiedad relacionada a experiencias previas muy desagradables que se manifiesta como angustia o terror al establecer contacto con algo que el individuo relacione con la experiencia nociva.

Las claves potenciales para que ocurra una respuesta ansiosa pueden incluir las amenazas psicosociales, la novedad, mecanismos cognitivos y memorias asociativas condicionadas. Así pues, en los ataques de pánico el miedo es por un sentimiento de muerte inminente; en las fobias sociales, la preocupación es la pena o ridículo social; en el estrés postraumático, la memoria emocional relacionada con el trauma; en el desorden compulsivo-obsesivo, las ideas obsesivas; en el desorden de ansiedad generalizada, no existen causas condicionadas específicas [Johnson y Lydiard, 1995].

Los modelos animales son una herramienta indispensable para estudiar los desórdenes del comportamiento, dentro de los que se encuentra la ansiedad. Las respuestas que se provocan en los animales son fisiológicas y no patológicas, sin embargo, los modelos son diseñados de tal manera que producen reacciones fisiológicas similares a las patologías humanas. Además, son validados por medidas estrictas puesto que también poseen un valor predictivo de las patologías y son

utilizados en el desarrollo de nuevos tratamientos. El conocimiento que se tiene hoy e día sobre los desórdenes emocionales se debe, en gran medida, a los estudios realizados a partir de modelos animales.

Neurobiología de la ansiedad

Noradrenalina.

En los años 80 la teoría prevalente acerca de la ansiedad proponía que se debía a un estado de continua activación de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* [Coplan y Lydiard, 1988]. El fundamento de esta hipótesis descansaba sobre el hecho de que el conjunto de desórdenes de ansiedad tienen en común un estado de alerta o miedo aumentado [Barbee, 1998] y, por lo tanto, eran conceptualizados como una versión anormal o exagerada de éste. El estado de alerta ha sido ampliamente estudiado en animales, denominado también como la respuesta de "alerta y huida" o respuesta de estrés agudo, y se caracteriza por de la activación del sistema noradrenérgico.

El *locus coeruleus* es el núcleo cerebral que contiene la mayoría de las neuronas noradrenérgicas, siendo la fuente principal de noradrenalina en el sistema nervioso central. Las neuronas noradrenérgicas proyectan bilateralmente desde el *locus coeruleus* a la corteza cerebral, al sistema límbico y a la médula espinal, entre otras proyecciones. En la figura 3, se muestran los principales circuitos noradrenérgicos del sistema nervioso central.

Bajo condiciones no estresantes la tasa de disparo de las neuronas del *locus coeruleus* es mínima, pero una vez que se percibe un estímulo, se activan las vías de señalización que van de la corteza sensorial hacia el tálamo; la tasa de disparo de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* aumenta y se provoca un estado de alerta hacia el ambiente por parte del individuo que percibió el estímulo novedoso. Si éste es una amenaza, el *locus coeruleus* presenta una actividad más intensa y prolongada, que activará entonces el sistema nervioso simpático [Thase et al., 1996]. La activación del sistema nervioso simpático provoca la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas que innervan el corazón, los vasos sanguíneos, los centros respiratorios y otros sitios que en conjunto, conforman parte de la respuesta aguda al estrés.

NORADRENALINA

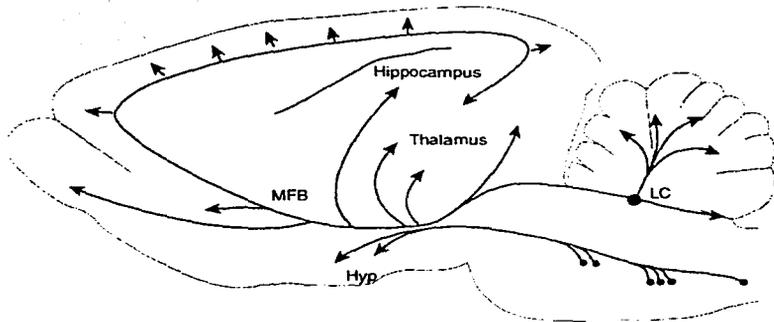


Figura 3. Vías principales de neurotransmisión de noradrenalina (o norepinefrina) en el sistema nervioso central de la rata. [Tomado de Zigmond, 1999].

Los síntomas crónicos que experimentan los pacientes que sufren de desórdenes de ansiedad, tales como los ataques de pánico, insomnio, sobresalto, e hiperactividad autonómica, son característicos de una función noradrenérgica aumentada [Thase et al., 1996].

Hacia una visión integral de los desórdenes de ansiedad.

En los últimos años, las limitaciones del uso de la respuesta aguda al estrés como modelo único para entender la ansiedad se han hecho evidentes. En primer lugar, el modelo de estrés agudo está relacionado directamente con el sistema de alerta más no con los desórdenes de ansiedad. La ansiedad difiere del estado de alerta en varios aspectos [Nutt *et al.*, 1998]: a) la percepción del agente estresante se encuentra fuera de proporción en comparación con su naturaleza real; b) la duración de los estados de ansiedad es mucho más larga que la respuesta inmediata de alerta, de ahí que se le

considere un desorden y no una respuesta natural adaptativa ante una amenaza y 3) la ansiedad puede manifestarse aún sin presencia de un agente estresante.

La teoría del estado de alerta continuo no ha sido confirmada con estudios clínicos. El tratamiento con drogas que involucran otros sistemas de neurotransmisión disminuyen eficazmente la ansiedad por lo que resultó evidente que aunque el sistema noradrenérgico jugaba un papel en los desórdenes de ansiedad, éste no era el único ni el más importante. En los últimos años, se ha propuesto que los desórdenes de ansiedad involucran a una gran cantidad de sistemas de neurotransmisión, neuroendócrinos y muchas regiones del SNC.

El estrés.

Los circuitos de respuesta al estrés son un componente básico de los desórdenes de ansiedad. El estrés produce dos respuestas endócrinas, a partir de la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) del hipotálamo, que dirigen el comportamiento del animal estimulado. La primera consiste en la activación del sistema adrenomedular (liberación de catecolaminas), la segunda involucra a la corteza adrenal y los corticosteroides.

El estrés provoca la liberación de la CRH del hipotálamo, que se transporta a través del sistema vascular porta hacia la adenohipófisis en donde estimula la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la cual tiene como blanco, la corteza y **médula** adrenales. En respuesta al estrés, se activa la vía que provoca la liberación de las catecolaminas de la médula adrenal, esta respuesta ocurre inmediatamente después de la presencia del estímulo o cuando se presenta de manera aguda y produce cambios fisiológicos inmediatos en el organismo, culminando en las reacciones metabólicas necesarias en una situación de "alerta y huida" [Thase et al., 1996]. Las acciones sobre la corteza adrenal son más lentas, típicamente ocurren una vez que el agente estresante ha desaparecido o cuando se presenta de manera crónica y se caracterizan por la liberación de los corticosteroides al torrente sanguíneo (cortisol en humanos y corticosterona en ratas y otros mamíferos). Se ha propuesto que éstos juegan un papel importante en el restablecimiento de la homeostasis después de una reacción de "alerta y huida" por medio de mecanismos de retroalimentación negativa [Korte, 2001]. En la figura 4 se presenta un esquema que muestra el circuito del estrés que involucra a los corticosteroides.

Además de su participación en la respuesta al estrés, los corticosteroides están involucrados en la consolidación de la memoria de los eventos estresantes, en la potenciación y extinción del miedo [Korte, 2001]. Pueden tener efectos negativos cuando sus acciones, vía los dos tipos de receptores a los que se unen específicamente (receptores mineralocorticoides –MR- y glucocorticoides –GR-), son alterados crónicamente y sus efectos pierden balance. Por ejemplo, se ha propuesto que una reducción en la cantidad de receptores mineralocorticoides puede reducir la extinción del miedo y, al mismo tiempo, una mayor cantidad de receptores glucocorticoides puede causar un aumento en el miedo condicionado, una fuerte consolidación de memorias traumáticas y una mayor potenciación del miedo. Es posible que esto lleve al individuo a experimentar miedo y angustia permanentes sin que exista una amenaza real, lo que puede desencadenar el desarrollo de un estado de ansiedad [Korte, 2001].

Los receptores MR o GR se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, en particular en áreas límbicas, por lo que éstas son blanco de las acciones de los glucocorticoides. Por ejemplo, se ha demostrado que éstos últimos estimulan la tasa de disparo de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo de Rafé y que estimulan su síntesis y liberación en el sistema límbico, en especial en la amígdala, en el hipocampo y en el septum, lo que también podría contribuir al establecimiento de un estado de ansiedad. La CRH además de iniciar la cascada de eventos que constituyen la respuesta al estrés, participa también como neurotransmisor y neuromodulador. Los sitios donde la CRH participa como mediadora en la expresión de conductas durante el estrés o el estado de alerta incluyen al núcleo paraventricular del hipotálamo, al *locus coeruleus*, al hipocampo, a los núcleos basales de las terminales estriadas y al núcleo central de la amígdala [Koob *et al.*, 1999].

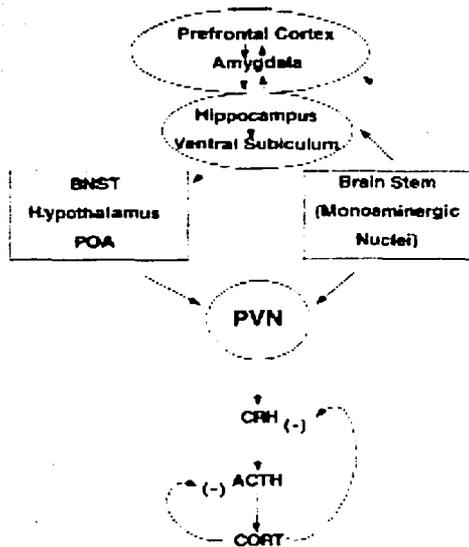


Figura 4.

El diagrama muestra las principales conexiones del circuito del estrés. Se ha demostrado la influencia de diferentes estructuras del cerebro frontal en la respuesta al estrés entre ellas, la corteza prefrontal, hipocampo, amígdala y el *septum*. Innervaciones monosinápticas y multisinápticas convergen en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), el integrador final de la respuesta al estrés. El NPV traduce la respuesta al estrés en respuesta endócrina secretando hormona liberadora de corticotropina (CRH) al sistema porta, que a su vez estimula hormona adrenocorticotrófica (ACTH) en la adenohipófisis y glucocorticoides en la corteza adrenal. Los glucocorticoides, retroalimentan negativamente este circuito, al inhibir la secreción y síntesis de ACTH al nivel de la hipófisis y de CRH a nivel hipotalámico y suprahipotalámico. Muchos sitios en el cerebro frontal como los núcleos basales de la estria terminal (BNST), el área preóptica (POA) y el hipotálamo anterior pueden transmitir información proveniente del hipocampo al NPV; (-) retroalimentación negativa. [Tomado de López *et al.*, 1999.]

Sustratos anatómicos de la ansiedad.

Sistema Límbico.

El sistema límbico está compuesto en parte por áreas de la corteza cerebral, por el hipocampo y el hipotálamo, que actúan en concierto en la expresión de las emociones. Papez en 1937, propuso que el sustrato cortical de las emociones es un anillo de corteza filogenéticamente primitivo llamado originalmente "lóbulo límbico" por Paul Broca. Está compuesto por el giro parahipocampal (continuación anterior e inferior del giro cingulado) y la corteza que subyace a la formación hipocampal [Kandel *et al.*, 1995]. En especial, se han involucrado dos áreas del sistema límbico que podrían funcionar como centros reguladores de las emociones en el cerebro. Estas son el hipocampo y la amígdala. El primero ha sido propuesto como un centro de almacenamiento de memoria, en especial de la verbal, la espacial y la contextual; mientras que la amígdala es comúnmente relacionada con el otorgamiento de un significado emotivo a ciertas situaciones o estímulos y como un área crítica en las respuestas al miedo [Ninan *et al.*, 1998].

Hipocampo.

Tiene conexiones con la corteza prefrontal y además recibe estímulos integrados de todos los sistemas sensoriales a través de la corteza entorrinal. Parece estar involucrado en otorgar un significado a los eventos en el tiempo y en el espacio y en las respuestas de miedo asociadas al contexto de situaciones estresantes. Recientes investigaciones utilizando técnicas no invasivas de neuroimagen como la resonancia magnética (MRI) y la tomografía de emisión de positrones (PET) han mostrado evidencias de que personas que sufren de estrés postraumático (un subtipo de ansiedad) tienen hipocampos significativamente más pequeños en comparación con individuos sanos. El volumen reducido parece reflejar directamente la atrofia de las dendritas de la región denominada CA3 [McEwen *et al.*, 1997]. Los animales sujetos a estrés psicosocial crónico desarrollan una atrofia hipocampal en la misma región [Magarinos *et al.*, 1998]. El aumento de glucocorticoides inducido por el estrés parece ser la causa de la atrofia neuronal [McEwen *et al.*, 1997]. Si un individuo presenta disfunción hipocampal se puede hipotetizar que es menos capaz de utilizar la memoria para evaluar la naturaleza de un agente estresante [McEwen, 1998] y que presentará una persistencia anormal de memorias traumáticas, como ocurre en los desórdenes de ansiedad.

Amígdala.

La amígdala tiene un el papel central en otorgar un valor emocional a las experiencias (figura 5). Los estímulos emocionales son detectados primeramente, por el tálamo sensorial de donde son transmitidos hacia la corteza sensorial, primero, y a la de asociación después. La corteza tiene conexiones recíprocas la amígdala. En la amígdala, la información es recibida y procesada en el núcleo lateral, de donde es transmitida al núcleo central que, a su vez, proyecta a muchos sitios del cerebro involucrados en las respuestas fisiológicas y del comportamiento al miedo (que incluyen al hipocampo, la corteza, el hipotálamo, entre otros) [Sajdyk *et al.*, 1999]. Las proyecciones a diversas regiones del hipotálamo activan el sistema nervioso simpático e inducen la liberación de las hormonas del estrés dentro de las que se incluye, como se mencionaba anteriormente, a la CRH. Otra proyección del núcleo central de la amígdala es la que conecta hacia diferentes sitios de la materia gris periacueductal que al ser estimulado inicia las respuestas analgésicas descendientes (que involucran a los opioides) que pueden entonces suprimir la sensación de dolor en una emergencia y que, al mismo tiempo, activan las respuestas al estrés especie-específicas, (por ejemplo, el comportamiento de congelamiento) [Sullivan *et al.*, 1998].

Corteza Frontal.

La corteza frontal (medial) está conectada recíprocamente con la amígdala, lo que causa una autorregulación del afecto y al mismo tiempo, una modulación de las funciones autonómica y neuroendócrina. El hipocampo y la amígdala que se encuentran inmediatamente adyacentes, el uno de la otra y que poseen conexiones entre ellos, proveen un sustrato neuroanatómico de la interacción entre el almacenamiento, la evocación de la memoria y del afecto. Probablemente, a través de esta interacción, así como a través de las conexiones corteza-corteza, las memorias almacenadas (que son reforzadas continuamente debido a las experiencias que se van viviendo) son intensificadas y desarrollan una mayor coherencia. Por medio de este circuito en parte, la respuesta ansiosa es controlada por la actividad cognitiva [Clement y Chapouthier, 1998].

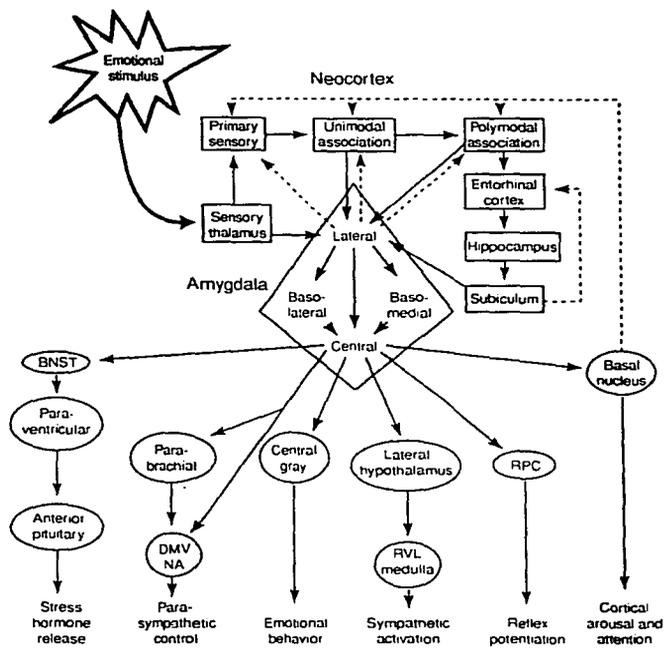


Figura 5. Modelo del circuito neuronal involucrado en el miedo condicionado. Una jerarquía de información sensorial converge en el núcleo lateral de la amígdala. A través de circuitos intra-amigdalinos, las señales de salida del núcleo lateral son transmitidas al núcleo central, que activa varios sistemas efectores involucrados en la expresión de respuestas emocionales. Las proyecciones directas son indicadas por las flechas sólidas y las de retroalimentación por líneas punteadas. BNST núcleo basales de la estria terminal; DMV, núcleo dorsal motor del vago; NA núcleo *ambiguis*; RPC núcleo *reticularis pontis caudalis*; RVL núcleos rostrales ventrolaterales de la médula. [Tomado de Zigmond *et al.*, 1999].

Septum.

Ha sido caracterizado como un activador durante la ansiedad ya que se ha observado que su ablación, o su inhibición farmacológica, reduce los comportamientos ansiogénicos en dos modelos de ansiedad (laberinto en cruz elevado y enterramiento defensivo) [López-Rubalcava *et al.*, 2000]. Debido a que el hipocampo y el *septum* se encuentran anatómicamente relacionados y a que las conexiones entre estas estructuras son principalmente excitadoras (se piensa que glutamatergicas, en particular) y van del hipocampo al *septum*, se ha propuesto que el hipocampo contribuye al papel excitador del *septum*, en los desórdenes de ansiedad. Esta hipótesis se ha confirmado en el modelo de laberinto en cruz elevado, pero no así en el de enterramiento defensivo [López-Rubalcava *et al.*, 2000]. Lo anterior muestra que estas dos estructuras actúan en concierto para regular algunos pero no todos los comportamientos relacionados con la ansiedad [Menard y Treit, 2001].

Las figuras 7 y 8 muestran dos esquemas que postulan modelos de la ansiedad.

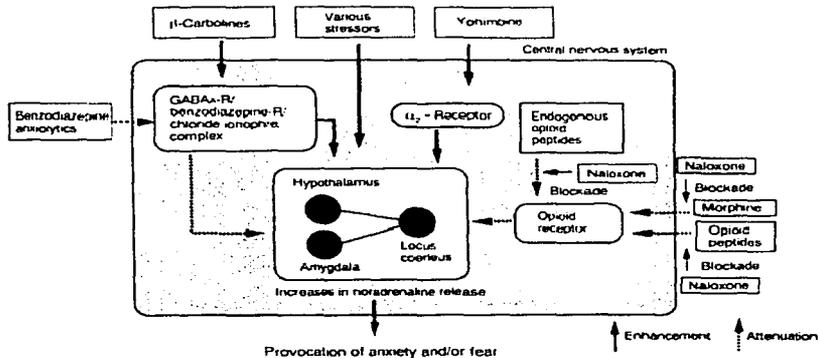


Figura 6. Hipótesis de la noradrenalina propuesta por Tanaka *et al.*, 2000.

El primer esquema propone los mecanismos que están involucrados en la provocación y reducción de la ansiedad. Se considera que el evento más importante es el aumento de noradrenalina liberada en el hipotálamo, la amígdala y el locus coeruleus. Los

En el segundo esquema, se postula que la ansiedad puede resultar de una alteración crónica del eje hipotalámico-hipófisis-adrenal. Los mecanismos de retroalimentación negativa normales son alterados y como resultado, los niveles de corticosteroides sanguíneos permanecen altos durante largos periodos de tiempo. Los corticosteroides estimularán las vías CRHérgicas en la amígdala central y en los núcleos basales del estriado terminal que proyectan al *locus coeruleus*, donde activarán vías noradrenérgicas. En el NPV fortalecerán la vía CRHérgica que desciende al tallo cerebral y estimula vías noradrenérgicas. En el núcleo de Rafé, estimularán la actividad serotoninérgica. Las vías noradrenérgicas activadas innervan el hipocampo, la amígdala y la corteza mientras que la vía serotoninérgica proyecta hacia el hipocampo, la amígdala y el septum. El aumento de la neurotransmisión noradrenérgica y serotoninérgica en regiones límbicas causan un estado de ansiedad. A continuación se describen en mayor detalle los sistemas de neurotransmisión involucrados en la ansiedad. Los esquemas anteriores muestran la complejidad de éste fenómeno, en donde las interacciones entre señales químicas y las regiones involucradas no pueden ser descritas fácilmente. Sin embargo, es posible definir algunos eventos que conforman la neurobiología básica de la ansiedad.

Sistemas de neurotransmisión.

Por lo menos cuatro vías de neurotransmisión están alteradas durante la ansiedad, si bien, puede haber alteraciones específicas dependiendo del subtipo de ansiedad que se presente. Éstas vías son: CRHérgica, noradrenérgica, serotoninérgica y GABAérgica [Coplan y Lydiard, 1988]. Existe una delicada coordinación entre estos neurotransmisores de tal manera que los cambios en una de las vías provocarán cambios en otra (u otras) vías de neurotransmisión, como por ejemplo, una perturbación en los procesos de retroalimentación.

El papel de la noradrenalina en los desórdenes de ansiedad se discutió previamente en el contexto de las primeras teorías neurales de esta patología y el papel de la CRH fue descrito en cuanto a su relación con el estrés. La participación de las vías serotoninérgica y la GABAérgica en los desórdenes de ansiedad, se describirán a continuación.

Serotonina.

Es un neurotransmisor involucrado en una gran variedad de comportamientos humanos que incluyen el control del apetito, el estado de ánimo, el sueño y la memoria [Zigmond *et al.*,1999]. Las neuronas serotoninérgicas se extienden del núcleo de Rafé en el tallo cerebral, a muchas regiones cerebrales entre ellas, la amígdala [Zigmond *et al.*,1999]. En la figura 9 se muestran las principales rutas serotoninérgicas del SNC.

La neurotransmisión serotoninérgica es un sistema complejo de mecanismos que involucran receptores pre y postsinápticos. De manera general la ansiedad está relacionada con aumento en la cantidad de serotonina y la ansiólisis, con disminución de la serotonina endógena [López-Rubalcava *et al.*, 1996]. Los receptores del tipo 5HT_{1A} se encuentran localizados en el sistema límbico; en particular en la neocorteza, septum, hipocampo y amígdala y, en el núcleo de Rafé donde se encuentran de manera somato-dendrítica (como autorreceptores).

SEROROTONINA

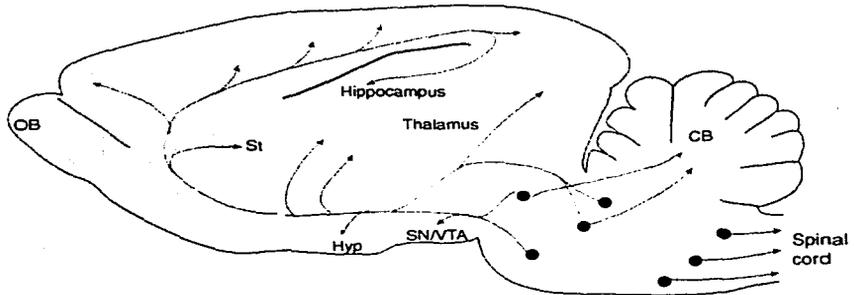


Figura 9. Vías serotoninérgicas principales en el sistema nervioso de la rata. Tomado de Zigmond *et al.*, 1999.

Existe una gran cantidad de evidencia que apoya que los agonistas a este receptor poseen actividad ansiolítica. Es muy probable que esta actividad pueda estar asociada a receptores pre y post sinápticos, afectada por las acciones agonistas de los receptores pre-sinápticos y antagonizadas por las de los post-sinápticos. Los receptores del tipo 5HT_{1B} que se encuentran principalmente en la *substantia nigra*, en el *globus pallidus* y en el estriado (núcleos caudado y putamen en los roedores), son autorreceptores presinápticos y, aunque se ha determinado que su actividad produce ansiedad, su participación en este tipo de desórdenes emocionales no se ha descrito claramente debido a que se ha sugerido que además de autorreceptores, son también heterorreceptores que modulan la liberación de otros neurotransmisores [López-Rubalcava *et al.*, 1996].

El papel que se le ha asignado a la serotonina en los desórdenes de ansiedad se basa en sus efectos moduladores sobre el *locus coeruleus* y en sus densas proyecciones a la amígdala [Ninan, 1999]. Por ejemplo, la baja actividad de este neurotransmisor en los desórdenes del comportamiento puede causar la desregulación de otros sistemas, dentro de los cuales se incluye el de la noradrenalina. Estos dos sistemas se encuentran fuertemente relacionados. La naturaleza precisa de esta interacción puede variar, de tal manera que, la actividad de la noradrenalina en terminales serotoninérgicas presinápticas puede llevar a un aumento en la liberación de serotonina [Ninan, 1999].

Existen evidencias experimentales que muestran que una menor actividad serotoninérgica en el hipocampo está relacionada con un incremento en la ansiedad. Esto sugiere que los cambios relacionados con la ansiedad en la función serotoninérgica ocurren de manera opuesta en el hipocampo en comparación con otras áreas del sistema nervioso central, donde en general la activación de esta vía está vinculada con ansiedad [Weiss y Uhde, 1990; López-Rubalcava *et al.*, 1998].

Los resultados contradictorios sobre la participación de la serotonina en los desórdenes de ansiedad pueden deberse a la gran variedad de receptores de este sistema y a su alta versatilidad de efectos en cuanto a la transmisión serotoninérgica. Ésto, aunado a la localización diferencial de los subtipos de receptores, puede ocasionar que la serotonina tenga efectos opuestos dependiendo del área que se estudie.

Ácido gamma-aminobutírico (GABA).

Es el principal neurotransmisor inhibitor en el SNC de los mamíferos encontrándose ampliamente distribuido. Existen dos tipos de receptores GABAérgicos: GABA_A y GABA_B, los primeros son canales iónicos (receptores ionotrópicos) permeables al ion Cl⁻ y además, los más predominantes en el sistema de neurotransmisión GABAérgica; los segundos, son receptores acoplados a proteínas G o metabotrópicos [Zigmond *et al.*, 1999]. Los agentes que facilitan la vía GABAérgica ionotrópica son ansiolíticos; aquéllos que la inhiben, son ansiogénicos. Por ejemplo, los moduladores positivos de la transmisión GABAérgica como las benzodiazepinas y los barbitúricos se han reportado como ansiolíticos en muchos estudios utilizando diferentes modelos animales de ansiedad [Treit, 1989]. En contraste, los antagonistas del receptor GABA_A, como la bicuculina y la picrotoxina, se han caracterizado como agentes típicamente ansiogénicos. Además, la elevación de niveles de GABA por medio de la inhibición de su enzima degradadora, GABAtransaminasa (GABA-T) produce efectos ansiolíticos en múltiples modelos entre los que se encuentran el de conflicto, campo abierto e interacción social. Los inhibidores de la recaptura de GABA también causan una disminución en la ansiedad [Weiss y Uhde, 1990; Charney y Bremner, ; Clement y Chapouhier, 1998].

En la ansiedad, los efectos de los sistemas GABA y serotoninérgicos están relacionados [Fernández-Guasti *et al.*, 1998]: se ha descubierto que las benzodiazepinas reducen el recambio de serotonina. En el hipocampo ventral, afectan los niveles extracelulares de serotonina, lo que correlaciona con una reducción en la ansiedad. Se ha sugerido que, la interacción de las benzodiazepinas con las neuronas serotoninérgicas es más relevante que su propiedad como activador de la vía GABAérgica, en lo que se refiere a sus efectos ansiolíticos [Weiss y Uhde, 1990].

MODELOS ANIMALES DE ANSIEDAD

Los modelos animales de patologías humanas han sido utilizados por muchos años para ayudar a identificar los factores etiológicos, las anomalías bioquímicas y fisiológicas que acompañan al estado patológico, así como para dirigir las estrategias en su tratamiento.

En cuanto a los modelos animales de ansiedad, es importante mencionar que la respuesta del animal a la situación a la que es sometido en las pruebas es adaptativa por lo que, en éstas, se mide un estado fisiológico y no uno patológico. Sin embargo, la diferencia entre los cambios bioquímicos que ocurren en la ansiedad fisiológica y los de la patológica, es solamente la intensidad y frecuencia, por lo que estos modelos pueden tener un valor predictivo para el estado patológico. Estos experimentos se han enfocado en medidas fisiológicas y conductuales que se parezcan a las observadas en la ansiedad humana o en procedimientos conductuales que permitan la identificación de agentes farmacológicos que reduzcan o eliminen específicamente la ansiedad patológica. Lo primero permite determinar eventos causales y las alteraciones bioquímicas y fisiológicas concomitantes asociados a la ansiedad; lo segundo, permite dilucidar manipulaciones ambientales y farmacológicas que puedan modificar la ansiedad [Weiss y Uhde, 1990].

Se han diseñado una gran variedad de modelos animales que examinan de manera particular la gran variedad de factores involucrados en ansiedad, éstos pueden clasificarse, generalmente, en tres clases. En la primera, las pruebas están basadas en conflicto o en miedo condicionado. En la segunda, la ansiedad es generada por un estímulo novedoso y en la tercera, la ansiedad es inducida químicamente [Koob *et al.*, 1998].

Las tres características básicas de los modelos animales de ansiedad son: selectividad, potencia relativa y sensibilidad dosis-dependiente. La selectividad se refiere a que el modelo no sea afectado por sustancias que sean efectivas en otros modelos de desórdenes del comportamiento. La potencia relativa implica que si se usan diferentes tratamientos o fármacos, la magnitud del efecto sobre el parámetro conductual que sea indicativo de la ansiedad, variará. La sensibilidad dependiente de dosis quiere decir que al usar un mismo tratamiento o fármaco, la respuesta del animal variará dependiendo de la cantidad administrada.

MODELO DE ANSIEDAD DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO

El modelo de ansiedad utilizado en este trabajo se denomina "Modelo de Enterramiento Defensivo", y fue propuesto inicialmente en 1981 por Treit, Pinel y Fibiger para medir los efectos de ansiolíticos de los químicos diazepam, clordiazepóxido y pentobarbital. Puede clasificarse dentro de los modelos que inducen ansiedad por un estímulo novedoso (Treit *et al.*, 1981).

Consiste en una caja de acrílico que tiene alrededor de 5cm de aserrín fino y un electrodo en una de las paredes. Antes del día de la prueba, los animales son habituados al ambiente de experimentación. Cuando el animal toca el electrodo, ocurre una descarga eléctrica leve de 0.3mA. La reacción del animal generalmente es la de enterrar el electrodo con el aserrín hasta que lo esconda.

El comportamiento se registra de acuerdo a los siguientes parámetros [Treit, 1981]:

- Latencia de enterramiento (LE); tiempo registrado desde el inicio de la prueba hasta que la rata empieza a enterrar el electrodo; medida de reactividad.
- Tiempo de enterramiento (TE); tiempo total que las ratas emplean en enterrar el electrodo; medida directa de "ansiedad" en la que a mayor tiempo de enterramiento, más ansiedad.
- Número de choques recibidos antes de empezar a enterrar el electrodo, después, y en total.
- Número de exploraciones al electrodo.
- Numero de exploraciones al aire.
- Observaciones generales del comportamiento del animal durante la prueba. (congelamiento, consumo de alimentos, movimiento excesivo, etc)

La prueba dura 10 minutos a partir de que el animal es colocado en la caja y se registra en un sistema de videograbado, de tal manera que el investigador no interfiere en la prueba mientras ésta se lleva a cabo. Las pruebas se realizan en el periodo de oscuridad del ciclo luz-oscuridad de las ratas, tomando en cuenta que estos son animales nocturnos, por lo que se encuentran más activos en la fase oscura de su ciclo.

Este modelo fue validado al comprobar que cumplía las características de los modelos animales de ansiedad. En el modelo de enterramiento defensivo, el aumento del tiempo que los animales invierten en enterrar el electrodo (tiempo total de enterramiento -TE-), es la medida directa de ansiedad; dicho comportamiento no es afectado por drogas estimulantes del sistema nervioso como la picrotoxina o las d-anfetaminas. Tampoco se modifica al tratar a las ratas con el narcótico analgésico morfina, mientras que con tratamientos ansiolíticos, el comportamiento se reduce. Lo

anterior demuestra que este modelo es selectivo ya que sólo las drogas relacionadas con la ansiedad alteran el comportamiento de los animales.

La potencia relativa del modelo se demuestra pues al utilizar tres tratamientos contra la ansiedad, el parámetro de enterramiento variaba de un tratamiento a otro: de las tres drogas ansiolíticas utilizadas en estos experimentos, diazepam, clordiazepóxido y pentobarbital, el primero inhibió más eficazmente el comportamiento de enterramiento defensivo. Al usar diferentes dosis de cada tratamiento, la magnitud de la inhibición del comportamiento de enterramiento varió hasta llegar a un límite en el que, debido a las altas dosis administradas, ya no existieron diferencias en el parámetro de ansiedad de los animales. Es decir, el modelo tiene sensibilidad dependiente de la dosis, que constituye la tercera condición a cumplir por los modelos animales de ansiedad.

El modelo de enterramiento defensivo posee ventajas que lo hacen especial. En primer lugar, para los roedores, el comportamiento de enterramiento es innato; el animal no tiene que aprender a reaccionar ante el estímulo aversivo del choque eléctrico por lo que su respuesta es muy cercana a lo que ocurriría en la naturaleza. En segundo lugar, la medida conductual que indica ansiedad, es un comportamiento activo por lo que resulta evidente y sencillo detectar y cuantificar cambios que alteren esta respuesta. En tercer lugar, se ha probado que este modelo es sumamente sensible puesto que, la respuesta de enterramiento defensivo, depende tanto del estado hormonal como de la etapa del desarrollo en que se encuentre el animal [Fernández-Guasti *et al.*, 1996]. Estas características hacen ideal el uso de este modelo en un trabajo como éste, en el que es de interés encontrar cambios endógenos en una vía de señalización y relacionarlos con parámetros conductuales.

TRH Y ANSIEDAD

La TRH está involucrada en la facilitación del estado de alerta. Estos efectos se han corroborado en especies de mamíferos como el oso negro [Azizi *et al.*, 1979], la marmota [Young *et al.*, 1979] y en ratas, en estas últimas, estimula la ocurrencia de comportamientos espontáneos [Arnold *et al.*, 1991]. Además, se ha detectado *in vitro* que microinyecciones de TRH en rebanadas de cerebro —área septal— tomadas de ardillas en incubación y activas, aumentan la frecuencia de actividad espontánea en todas las neuronas provenientes de las ardillas en hibernación y en la mayoría de las provenientes de ardillas activas [Belousov y Belousova, 1993].

Inyecciones sistémicas de preproTRH 178-199 (PP TRH) en ratas post-natales (3 días) pueden atenuar las medidas de ansiedad (vocalizaciones) en un modelo de desorden de ansiedad (ansiedad por separación) así como disminuir índices de estrés (niveles menores de ACTH y corticosterona. séricas) [Stahl *et al.*, 2002].

Aunque no existe evidencia directa que relacione a la TRH con la neurobiología de la ansiedad, existen suficientes evidencias indirectas que hacen probable su participación. Los ejemplos mencionados de las actividades extrahipofisiotrópicas de este neuropéptido, su colocalización con otros sistemas de neurotransmisión relacionadas con los de la ansiedad, la presencia de los componentes de su vía de señalización en áreas relacionadas con estos desórdenes y los estudios por medio de inyección de TRH o de sus análogos (que aumentan el estado de alerta y tienen efectos antidepressivos, entre otros), permiten suponer que las vías TRHérgicas puedan participar en la fisiología de la ansiedad.

II. JUSTIFICACIÓN

La participación de la TRH como neuromodulador se ha apoyado por estudios farmacológicos que inducen cambios conductuales en los animales y en humanos (disminuye el consumo de agua y alimento, induce la activación del sistema locomotor, efecto termorregulador, implicado en depresión, en epilepsia, revierte efectos narcóticos e hipotérmicos de la inyección i.p. de etanol).

Mediante el estudio de tres paradigmas experimentales en los cuales se reportaron cambios en el metabolismo de la TRH hipotalámica y en algunas regiones extrahipotalámicas, se logró demostrar que el metabolismo de la TRH es regulable (estimulación por frío, estimulación eléctrica subconvulsiva [de Gortari *et al.*, 1995,1998] administración aguda ó crónica de etanol [de Gortari *et al.*, 2000 -A- y de Gortari *et al.*, 2002] y estrés por ayuno [de Gortari *et al.*, 2000 -B-]). Los cambios encontrados en el sistema límbico [de Gortari *et al.*, 2000 -C-] permiten implicar a las vías TRHérgicas en alguna función relacionada con estos paradigmas. Se estudió el modelo de depresión (prueba de Porsolt), en donde se encontró activación de la vía TRHérgica en el hipocampo. El estudio del modelo de ansiedad permitirá definir si la función de la vía TRHérgica está relacionada con los sistemas que participan en la ansiedad.

III. HIPÓTESIS.

Si hay cambios en la concentración de corticosterona sérica en alguno de los grupos de ratas sometidos al modelo de ansiedad, entonces el modelo provoca estrés.

Si la corticosterona no varía entre los grupos habituados y los sometidos al modelo de ansiedad, entonces la habituación es considerada como eficaz.

Si se observan cambios en contenido de la TRH y niveles de su RNAm en las regiones estudiadas, entonces es probable que su metabolismo se haya alterado y que por lo tanto, la TRH participe en la ansiedad.

Si se encuentra correlación entre los cambios en concentración de corticosterona y los de TRH, entonces éstos últimos pueden deberse al estrés.

Si se cuantifica un aumento en contenido de TRH, entonces habrá ocurrido un aumento en la conversión TRHgly-TRH ó una inhibición de su liberación.

Si se detectan niveles más altos de RNAm de Pro-TRH, entonces es posible que haya aumentado la síntesis de TRH.

Si se encuentra una correlación significativa entre la TRH y el tiempo de enterramiento, entonces la TRH participa directamente en la ansiedad.

IV. OBJETIVOS

Describir los cambios en el metabolismo de la TRH en el sistema límbico de la rata en la ansiedad usando el modelo de Enterramiento Defensivo.

Definir, por medio de un estudio conductual, la función neuromoduladora de la TRH en el sistema límbico de la rata en la ansiedad correlacionando la actividad de las vías TRHérgicas, (cuantificando los niveles de TRH y su RNAm) con una conducta determinada.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES Y MODELO EXPERIMENTAL

Ratas Wistar macho adultas (249-350 g) se mantuvieron en grupos de 8, por caja, con ciclos de luz-oscuridad invertidos (periodo de luz de 22:00-10:00) en el bioterio del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Sur del Instituto Politécnico Nacional (IPN); con acceso *ad libitum* a agua y comida. El cuarto de experimentación estuvo frente al bioterio bajo el mismo ciclo y las pruebas se realizaron durante la fase oscura del ciclo luz-oscuridad.

Prueba de Enterramiento Defensivo

Esta prueba consistió en someter a los animales a una caja de experimentación durante 10 min con un estímulo aversivo que era un electrodo que al ser tocado proporcionaba un choque eléctrico de baja intensidad. En respuesta a la descarga eléctrica el animal presenta un comportamiento típico, en el que mueve sus extremidades para enterrar el electrodo (comportamiento de enterramiento defensivo) que es la medida directa de ansiedad, en la que a mayor tiempo de enterramiento, mayor ansiedad. Para evitar posibles alteraciones debido a la novedad causada por el cambio de ambiente en el animal, los animales fueron habituadas al contacto humano (manipulándolos), al cuarto de experimentación y a la caja de prueba (colocándolos por diez minutos en la caja de prueba sin electrodo) durante los dos días previos a la prueba.

Cámara de experimentación

Caja de acrílico de 27 x 16 x 23 cm, cubierta en el fondo homogéneamente por una capa de 5 cm de aserrín; en una de las paredes se encontraba un pequeño orificio 2 cm arriba del aserrín por el cual fue introducido el electrodo (7 cm de largo). Al contacto, las ratas recibían una descarga de 0.3 mA [corriente constante La Fayette Instruments Co., modelo 5806]. Al inicio de la prueba, las ratas fueron colocadas en la esquina opuesta al orificio. Frente a la cámara se colocó una videograbadora [Sony] que registró todos los movimientos del animal durante la prueba. Después de colocar a la rata en la caja, el investigador abandonaba el cuarto de experimentación. Se mantuvo un orden en el registro

del video para comparar los parámetros conductuales, con las determinaciones bioquímicas.

Grupos experimentales

Grupos de 8 ratas habituadas por 2 días se dividieron al 3er. día en 3 conjuntos:

- A) Ratas sacrificadas al 3er día sin ser expuestas a la cámara. [*Controles Basales, CB*]
- B) Ratas introducidas a la cámara (sin electrodo) durante 10 min y sacrificadas 30 y 60 min después. [*Controles experimentales, CE*]
- C) Ratas introducidas a la cámara (con electrodo) durante 10 min y sacrificadas 30 y 60 min después. [*Experimentales, E*]

Medidas conductuales

A partir de las cintas de video se cuantificó: a) el tiempo en segundos que la rata tardó en empezar a enterrar el electrodo ó latencia al enterramiento, (*LE*) después de que el animal recibió la primer descarga (choque); es una medida de reactividad en la que se considera que mientras menor sea la latencia, mayor era la capacidad de respuesta; b) el tiempo total que la rata invirtió en enterrar el electrodo ó tiempo total de enterramiento, (*TE*), medida directa de ansiedad, mientras mayor fue éste, mayor era su estado de alerta que en este modelo es equivalente a la ansiedad; c) el número de choques totales (*CHI*); d) las exploraciones al aire y e) el número de exploraciones al electrodo sin que hubiera choque.

Los animales se sacrificaron por decapitación, se colectó la sangre y una vez coagulada se separó el suero centrifugando a 5000 x g durante 10 min, para la cuantificación de corticosterona y se guardó a -20° C. Los cerebros se extrajeron, colocaron en hielo seco y se almacenaron a -70° C en un ultracongelador [Thermo forma ultra freezer].

Se utilizó el atlas Paxinos [Paxinos y Watson, 1998] para realizar los cortes y diseccionar las siguientes estructuras en todos los cerebros sobre hielo seco para mantenerlos congelados: hipotálamo, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo y septum. El lado izquierdo y el derecho se almacenaron

por separado [tubos Eppendorf nuevos de 1.5ml] en un ultracongelador a -70° C. El lado derecho se utilizó para la semi-cuantificación de RNA mensajero de TRH y el izquierdo para el radioinmunoensayo de TRH y la cuantificación de proteína total por el método de Lowry.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

Extracción de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH)

Los lados izquierdos de cada región se sonicaron en 500 µl de ácido acético [Merck] al 20 %. Se utilizaron 30 µl para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry [Lowry et al., 1951]. El resto del homogenado se centrifugó a 20800 x g durante 15 min a 4° C [Eppendorf Centrifuge 5810 R]. Se obtuvieron 420 µl del sobrenadante al que se agregaron 800 µl de metanol al 100% [J.T. Baker], se agitó [vortex Daigger Vortex Genie 2] y se mantuvieron a -20° C durante 12 horas [Congelador y Refrigerador General Electric Profile]. Las muestras se centrifugaron a 10500 x g durante 15 min a 4° C; el sobrenadante se recuperó y secó en el concentrador por vacío con una trampa de condensación refrigerada [Speed Vac Concentrator Savant]. El sedimento se utilizó para la cuantificación de la TRH por radioinmunoensayo.

Radioinmunoensayo (RIA) de la TRH

El RIA es un ensayo de "unión competitiva" que se basa en la competencia entre el ligando frío de las muestras y el marcado, en este caso, TRH-iodinado (125 TRH). El anticuerpo anti-TRH y las condiciones de ensayo fueron previamente optimizadas [Joseph-Bravo et al., 1979; Mendez et al., 1987]

El TRH se iodinó por el método de cloramina T utilizando 125 [Perkin Elmer] y una columna de sephadex.

El RIA se llevó a cabo en una solución amortiguadora (buffer-RIA, ver anexo). Las muestras problema, antígeno estándar o iodinado, así como el anticuerpo se diluyeron en esta solución.

Los extractos de tejido se resuspendieron en buffer-RIA: hipotálamo y corteza: 500 µl. núcleo accumbens, septum, amígdala e hipocampo: 250 µl.

Mezcla de incubación

100 μ l. de anticuerpo contra TRH (R_2).

100 μ l de solución conteniendo TRH estándar o muestras problema (extractos)

100 μ l de buffer RIA conteniendo 5000 cpm de 125 TRH.

Para la preparación de la curva estándar se hicieron, previamente, diluciones de TRH [Sigma] que contenían en 100 μ l: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg de la TRH.

Se incluyó, además, un "estándar interno" que consistió en un extracto de hipotálamo de rata utilizado a 4 diluciones. Éste debe comportarse en forma paralela a la curva estándar y debe dar valores equivalentes en los RIAs realizados a distintos tiempos.

A los tubos de 0 pg, no se añade muestra problema ni estándar (se añadió sólo buffer); a éstos se les denominó B_0 . Adicionalmente, se prepararon 3 tubos que contenían únicamente 100 μ l de 125 TRH+ 200 μ l de buffer que no fueron centrifugados (cuentas totales = T). Las muestras problema se analizaron por duplicado.

Los tubos se agitaron y se dejaron incubar durante 36-48h a 4°C. Posteriormente, se añadió 1ml. de etanol frío [Merck] se agitaron bien en un vortex (precipitación del antígeno unido al anticuerpo) y se centrifugaron a 980 x g por 30 min. a 4°C [Beckman J-6B]. El sobrenadante se succionó con un extractor en la cámara de radioinmunoensayo y se leyeron las cuentas por minuto (cpm) en un aparato de conteo de radiaciones gamma [LKB Wallace Miligamma Counter].

Se transformaron los valores en cpm de las curvas estándar y de las muestras utilizando el Software "enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log a picogramos (pg) de TRH. Los RIA tenían una variación intra e interensayo del 15%, así como una sensibilidad entre 20 y 2000 pg. Los resultados del radioinmunoensayo de TRH se estandarizaron con las proteínas totales obtenidas por el método de Lowry (TRH/mg proteína).

Cuantificación de Proteína Total por el Método de Lowry [Lowry et al., 1951].

Las muestras se prepararon agregando 30 µl de NaOH [J.T. Baker] 4.5N y se dejaron hidrolizar de 12 a 18 horas a temperatura ambiente. Se centrifugaron [Eppendorf 5415] a máxima velocidad por 1 min. y se tomaron alícuotas por duplicado (hipocampo y corteza: 10 µl. núcleo accumbens, septum, hipotálamo y amígdala: 20 µl) y se completó a un volumen de 200 µl con NaOH 0.5 N.

Para la curva estándar, se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) [Sigma] para lo que se prepararon tubos por duplicado que contenían en 100 µl de agua: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg de albúmina. Se agregó 100 µl de NaOH.

A todos los tubos (curva estándar y tubos problema), se añadió 900 µl de Solución E (ver anexo); se agitaron y se dejaron incubando por 10 min a temperatura ambiente y se añadió 100 µl de Solución Folin 1N [Sigma Folin and Ciocalteu's Phenol Reagent] diluida en agua (1:2), se mezclaron y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbencia de las muestras problema y de la curva estándar a 750 nm [Beckman DU 650 Spectrophotometer].

Radioinmunoensayo de Corticosterona

Se realizó una dilución 1:1000 de todas las muestras tomando: 10 µl de suero y 5 ml de buffer diluyente de esteroides (ver anexo). Se tomaron 500 µl de las diluciones de todas las muestras.

El anticuerpo (Ab) contra corticosterona [ICN Farmacéutica] se diluyó a partir de alícuotas de 20 µl de una dilución inicial de 1:12 para obtener una dilución de trabajo de 1:1200.

La corticosterona tritiada (³H-Cor) [Amersham] contenía 100 cpm/µl (ver anexo).

Mezcla de incubación

100 µl de anticuerpo contra Corticosterona

500 µl de solución conteniendo Corticosterona estándar o muestras problema

100 µl de amortiguador diluyente de esteroides conteniendo 10000 cpm de (³H-Cor).

Para la preparación de la curva estándar se hicieron, previamente, diluciones de Corticosterona estándar [ICN Farmacéutica] que contenían: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg en 500 µl.

A los tubos de 0 pg, no se añade muestra problema ni estándar (se añadió sólo buffer) a éstos se les denominó B₀

Los tubos del pegado no específico contenían 600 µl de amortiguador diluyente de esteroides.

Tubos de cpm totales: 800 µl amortiguador diluyente de esteroides.

Los tubos se agitaron e incubaron a 98°C durante 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se incubaron, nuevamente, durante 24 horas a 4° C. El antígeno no unido al anticuerpo, se separó mediante la adición de 200 µl de una solución carbón-dextrán a 4° C agitada durante 20 seg e incubada durante 20 min a 4° C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 980 x g durante 15 min. Los sobrenadantes resultantes, se transfirieron a tubos para conteo de radiaciones β a los que se les adicionaron 4ml de líquido de centelleo [Ecolite, ICN]. Cada tubo se midió en el aparato de conteo de radiaciones β [Beckman] durante un minuto, empezando por la curva estándar. Se transformaron los valores en cpm de las curvas estándar y de las muestras utilizando el Software "enri" de transformación matemática a través de una regresión logit-log a microgramos de corticosterona.

Extracción de RNA total [Chomczynski y Sacchi, 1987].

Todo el material fue esterilizado, previamente, en autoclave [Tuttnauer Brinkmann 2540 M] por 40 min a 121° C. Todas las soluciones utilizaron agua tratada con DEPC (ver anexo) y esterilizada.

Se utilizó el método de tiocianato de guanidina descrito por Chomczynski y Sacchi, 1987.

Los tejidos (lado derecho) se sonicaron en tubos de microcentrifuga con 0.05 ml/g de solución desnaturalizante "Solución D" (ver anexo).

Los tejidos fueron sonicados (hipotálamo: 150 µl; núcleo accumbens y septum: 250 µl; corteza frontal y amígdala: 500 µl y 750 µl para hipocampo) [Sonics Vibra Cell Ultrasonic Processor], por no más de 10 seg a un máximo de 9 watts, manteniendo los tubos a 4° C. Posteriormente, se agregó agitando bien a cada

paso, 1/10 del volumen del homogenado, de acetato de sodio 2 M pH 4.0 [Sigma], un volumen de fenol saturado en agua [Sigma], 0.2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico 49:1 v/v [Sigma]. Las muestras se dejaron reposar durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 10500 x g por 20 min a 4° C. Se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de isopropanol [Sigma] y se guardaron todas las muestras a -20° C toda la noche. Las muestras se centrifugaron a 18000 x g por 20 min a 4° C, se obtuvo el sobrenadante con cuidado y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 7 min máximo. Las muestras se resuspendieron en solución D (1/3 del volumen inicial del homogenado), se agregó agitando cada vez: un volumen de fenol saturado en agua, un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 49:1 v/v y centrifugaron (10500 x g por 22 min). A la fase acuosa se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto [Merck], se agitaron, se guardaron a -70° C toda la noche. Se centrifugaron a 20800 x g por 30 min a 4° C; se retiró con cuidado el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente (max 7 min). Se añadió 250 µl de etanol al 70% y se agitó hasta despegar la pastilla de RNA precipitada, se centrifugó nuevamente por 12 min, se repitió el lavado con etanol al 70 %.

Finalmente, las muestras se secaron en un concentrador por vacío de 5 a 7 minutos, obteniendo el precipitado de RNA total, el cual se resuspendió en 50 µl de agua tratada con DEPC y filtrada. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (2µl de muestra en 500 µl de agua destilada) [Eppendorf BioPhotometer] a 260, 230 y 280 nm. Sólo se utilizaron para la transcripción reversa, muestras cuya relación 260/230 fuera >1.5. Si ésta resultaba menor a 1.5, se agregaba al resuspendido: 1/25 de su volumen inicial (2 µl) de acetato de sodio 2 M pH 4.0 y 3 volúmenes (150 µl) de etanol absoluto. Se mantenían a -70° C toda la noche y al día siguiente se repetían la última centrifugación y los lavados con etanol al 70 %.

Las muestras cuyas relaciones 260/230 y 260/280 fueron mayores a 1.5 se consideraron adecuadas para la reacción de RT-PCR y se mantuvieron a -70°C.

Procedimiento para realizar RT-PCR

Preparación del DNAC

Se tomó el volumen necesario de RNA total (tomando en cuenta que $DO \text{ a } 230 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 40/1000 = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$) para obtener alicuotas que tuvieran una concentración de $1 \mu\text{g RNA} / 12 \mu\text{l}$ de agua bidestilada estéril tratada con DEPC para las regiones hipotálamo, núcleo accumbens e hipocampo, mientras que para la amígdala se tomó el volumen necesario de RNA total para obtener alicuotas de $2 \mu\text{g RNA} / 12 \mu\text{l}$ de agua bidestilada estéril tratada con DEPC. Las muestras se incubaron a 65°C por 5 minutos [Lauda E 100 006T], se les dio un pulso en una centrífuga [Eppendorf Centrifuge 5417C] y se agregaron $20 \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción para DNAC (ver anexo) y se incubaron por 2 horas a 37°C en el mismo baño. Al término de la incubación, se tomaron por duplicado, $6 \mu\text{l}$ del DNAC de las regiones: hipotálamo, núcleo accumbens y amígdala y $12 \mu\text{l}$ para el hipocampo.

Procedimiento para la PCR

Se amplificó por separado el DNAC de TRH del de G3PDH (se usó para estandarizar las medidas del cDNA de TRH) utilizando alicuotas de $6 \mu\text{l}$ (RNA de amígdala, hipotálamo, núcleo accumbens) ó $12 \mu\text{l}$ (hipocampo) de la solución de DNAC agregando $44 \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción para PCR (ver anexo). Las muestras se colocaron en un termociclador [Eppendorf Mastercycler Gradient]. Tanto para la amplificación de TRH como para la de G3PDH, las condiciones de amplificación para hipotálamo, núcleo accumbens e hipocampo, fueron las siguientes: 30 ciclos de $1'15''$ a 95°C , $1'00''$ a 60°C , $1'00''$ a 72°C y 1 ciclo de $15'$ a 72°C ; para amígdala, 35 ciclos de $1'15''$ a 95°C , $1'00''$ a 60°C , $1'00''$ a 72°C .

Semi-cuantificación de RNAm de Pro-TRH

Se realizaron 4 geles –uno por región- de agarosa al 2% en cámaras para electroforesis [Owl] (ver anexo). A $10 \mu\text{l}$ de la reacción de RT-PCR de TRH y $10 \mu\text{l}$ de la de G3PDH se les agregó $2 \mu\text{l}$ de colorante azul de bromofenol y xylol cyanol [Sigma] y se mezclaron dándoles un pulso a máxima velocidad en una centrífuga [Eppendorf Centrifuge 5415]. Las muestras ($22 \mu\text{l}$ volumen final por

muestra) y el marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker IV 0.07-19.3 Kbp fueron cargadas a los geles que se corrieron por alrededor de 1hr 30 min a 100 V (voltaje) [fuente de poder EC 105 Apparatus Corporation]. Los geles fueron posteriormente teñidos en una solución de bromuro de etidio [Sigma] con agua destilada (0.006 %) durante 10 min en un agitador [Junior Orbit Shaker Lab. Line Instruments] y lavados en una charola con agua destilada en agitación durante 25 minutos.

Finalmente, los geles se digitalizaron en un analizador de imágenes [BioRad Multianalyst], el cual analiza las densidades de bandas, transformándolas en unidades ópticas. El valor de la banda de DNA de TRH se relacionó con el de G3PDH (cDNA_{proTRH}/G3PDH) y se obtuvieron unidades arbitrarias que pueden compararse entre sí.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se compararon los distintos controles y los grupos experimentales (valores crudos) mediante análisis de varianzas de una vía (ANOVA) y pruebas post-hoc de Fisher [Software StatView]. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando la $p < 0.05$.

Se realizaron correlaciones (mediante la prueba de mínimos cuadrados) entre: cambios en niveles de corticosterona y cambios en contenido de TRH por región; cambios en niveles de corticosterona y los parámetros del comportamiento (Latencia al Enterramiento –LE-, número total de choques –CHt- y Tiempo de Enterramiento –TE-); cambios en niveles de corticosterona y cambios en contenido de TRH por región y finalmente, cambios en contenido de TRH por región con los mismos parámetros del comportamiento. Se consideró que existía una correlación estadísticamente significativa cuando el coeficiente de correlación (R^2) $R^2 > 0.65$.

VI. RESULTADOS

El aumento en la concentración de corticosterona en suero se considera la respuesta fisiológica al estrés. Al comparar el contenido de corticosterona entre el grupo de animales que fue habituado al cambio de ambiente, durante los dos días precedentes pero el día de la experimentación no entró a la caja (CB) y el grupo de animales que, en lugar de recibir choques eléctricos fue sometido a un tercer periodo de habituación y sacrificado después del mismo intervalo de tiempo que los dos grupos experimentales (CE 30 y 60), no se encontraron diferencias significativas (Gráfica 1). Esto sugiere que la habituación fue adecuada y el ambiente de experimentación ya no constituía un estímulo estresante por sí mismo. Los animales sometidos a descargas por el electrodo, referidos como experimentales en este trabajo (sacrificados 30 y 60 minutos después de la prueba = experimental 30' -E 30- y experimental 60' -E 60-) si presentaron cambios en la concentración de corticosterona aumentando significativamente ($p < 0.05$) en E 30 ($n=7$; $155 \pm 18 \%$) respecto al grupo CB ($CB=100 \pm 10 \%$).

Los contenidos de TRH y de su RNAm variaron dependiendo de la región de estudio. En el hipotálamo (Gráfica 2) se observó un aumento significativo en la concentración de TRH ($p < 0.05$) sólo en CE ($297 \pm 19 \%$) a los 30 minutos contra CB ($100 \pm 51 \%$), mientras que el contenido de RNAm de Pro-TRH incrementó significativamente ($p < 0.05$) en E 60 ($n = 6$; $213 \pm 17 \%$) con respecto a los valores basales ($n = 6$; $CB=100 \pm 27 \%$).

En la amígdala (Gráfica 3) no hubo diferencias en concentración de TRH entre CB ($n = 5$) y los dos grupos CE ($n = 5$, en cada grupo); sin embargo, el contenido de TRH se incrementó, significativamente, en E 30 ($n = 3$) con respecto a los otros grupos, en particular, este incremento fue del $130 \pm 15\%$, respecto a valores basales y del $181 \pm 15 \%$, respecto a CE 30. El RNAm de Pro-TRH disminuyó, significativamente ($p < 0.05$), en los grupos experimentales E 30 ($n = 5$; $24 \pm 41 \%$) y E 60 ($n = 6$; $25 \pm 26 \%$), respecto a valores basales ($n = 4$; $CB = 100 \pm 32 \%$). Al comparar E 30 con CE 30 ($n=7$), la disminución también resultó significativa ($p < 0.05$) y fue del $64 \pm 41 \%$. Los cambios observados tanto en el contenido de

TRH como en cantidad de RNAm de Pro-TRH, son exclusivos de los grupos sometidos al modelo de ansiedad.

El hipocampo (Gráfica 4) mostró un incremento en la concentración de TRH en CE 60 (n = 7) que no fue significativo, comparado contra CB (n = 6), pero sí contra E 60 ($p < 0.05$), siendo, en este caso, del $114 \pm 13 \%$. El RNAm de Pro-TRH aumentó, significativamente ($p < 0.05$), en CE 30 (n = 7; $188 \pm 7 \%$); en CE 60 (n = 5; $198 \pm 16 \%$); en E 30 (n = 6; $195 \pm 18 \%$) y en E 60 (n = 6; $173 \pm 5 \%$; $p < 0.05$), respecto a los valores basales (n = 5; CB = $100 \pm 24 \%$), pero no hubo diferencias entre ellos.

En la corteza frontal (Gráfica 5), el contenido de TRH mostró un incremento significativo ($p < 0.05$), respecto a los valores basales (n = 7; CB = $100 \pm 17 \%$), en los grupos CE y E: la concentración de TRH aumentó en CE 30 (n = 7; $193 \pm 9 \%$), en CE 60 ($202 \pm 17 \%$) y en E 60 ($189 \pm 18 \%$). El aumento en E 30, no fue estadísticamente significativo, posiblemente debido al gran error estándar (n = 7; 283 ± 57) lo que se podría verificar al aumentar el tamaño de muestra. No hubo diferencias significativas entre los grupos CE y E. En esta región no se detecta RNAm de Pro-TRH [Lechan, 1986].

El septum (Gráfica 6) sólo presentó cambios en CE 60 (n = 5; $171 \pm 26\%$) en donde la concentración de TRH aumentó significativamente ($p < 0.05$) respecto al contenido basal (CB = $100 \pm 12 \%$). No fue posible cuantificar al RNAm de Pro-TRH por problemas metodológicos durante la extracción de RNA total.

El RIA de TRH ha sido previamente optimizado y las diluciones utilizadas adecuadas para cada región. Sin embargo, las muestras de núcleo accumbens de todos los animales tuvieron mayor concentración, superior al límite de la curva estándar, por lo que no fue posible su cuantificación. Se cuenta sólo con los datos del RNAm de Pro-TRH (Gráfica 7) que mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la cantidad de RNAm de Pro-TRH en CE 60 (n = 6; $51 \pm 17 \%$) y en E 30 (n = 5; $30 \pm 12 \%$) contra valores basales (n = 5; CB = $100 \pm 24 \%$). La disminución en E 30 también resultó significativa ($p < 0.05$) respecto a CE 30 (n = 7) y fue, en este caso, del $76 \pm 12 \%$. La disminución de RNAm de Pro-TRH

en E 30 es la única diferencia que parece deberse a la ansiedad aunque, al ser equivalentes CE 60 y E 60 podría reflejar un cambio por el reconocimiento de la caja de experimentación.

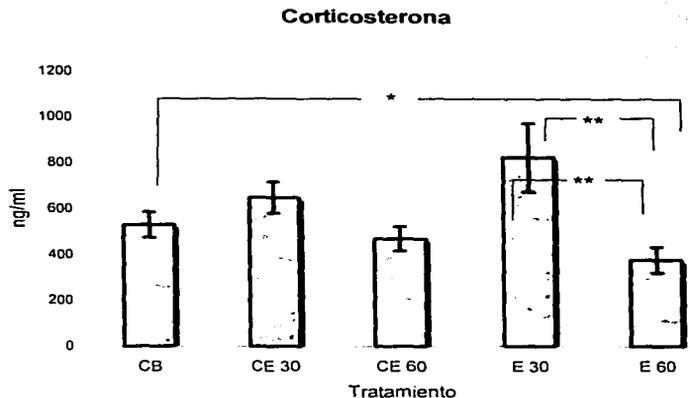
Como la corticosterona tiene efecto sobre el metabolismo del TRH en el NPV y existen receptores a glucocorticoides en el cerebro, se realizaron correlaciones intragrupales entre los cambios de corticosterona sérica y los de contenido de TRH y RNAm de Pro TRH por región, para verificar cuáles eran debidos al estrés, pero no se encontraron correlaciones significativas en ninguna región.

También se correlacionaron los cambios de TRH por región, con los parámetros del comportamiento característicos de la prueba de enterramiento defensivo [tiempo en que tardaron en empezar a enterrar el electrodo después de haber recibido la primera descarga eléctrica o latencia al enterramiento (LE); tiempo total invertido en enterrar el electrodo (TE) y el número total de choques recibidos durante la prueba (CHt)]. La Tabla 1. muestra los parámetros del comportamiento que fueron cuantificados a partir de las cintas de grabación. Se encontraron correlaciones sólo en amígdala, sin embargo, es conveniente tomarlas en cuenta únicamente como tendencias debido al bajo número de muestra (n) con el que se contó en este caso.

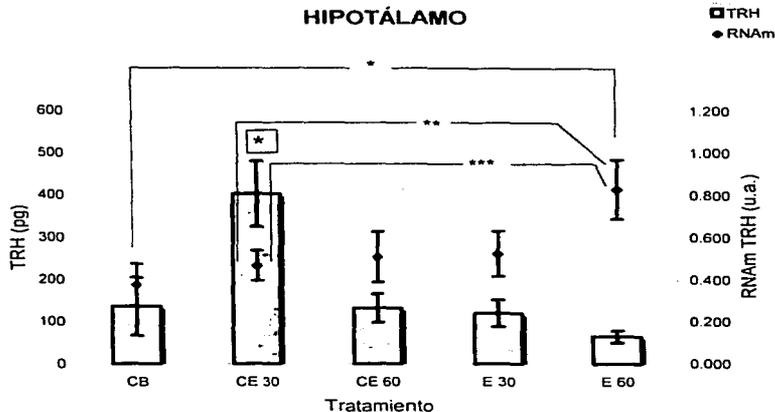
En la amígdala (Gráfica 8), los cambios en contenido de TRH en E 30 respecto a CE 30 (n = 3) correlacionaron con el número de choques totales -CHt- ($R^2 > 0.65$) y no así con el tiempo de enterramiento -TE- ($R^2 < 0.65$), aunque estos parámetros correlacionen entre sí. El aumento de TRH en amígdala en E 30 es directamente proporcional al número total de choques recibidos.

El tiempo total de enterramiento y el número de choques recibidos, correlacionaron significativamente ($R^2 < 0.65$) en todos los animales sujetos al modelo de ansiedad: a mayor tiempo de enterramiento, más choques recibieron. (Gráfica 9).

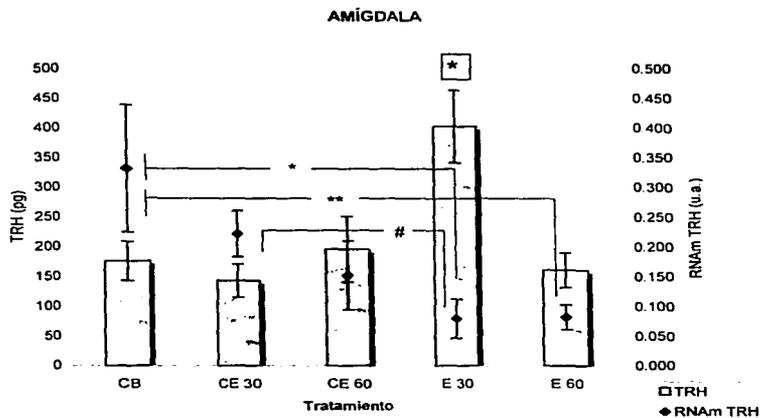
No hubo correlaciones significativas entre los cambios en corticosterona de los grupos sometidos al modelo de ansiedad con parámetros del comportamiento.



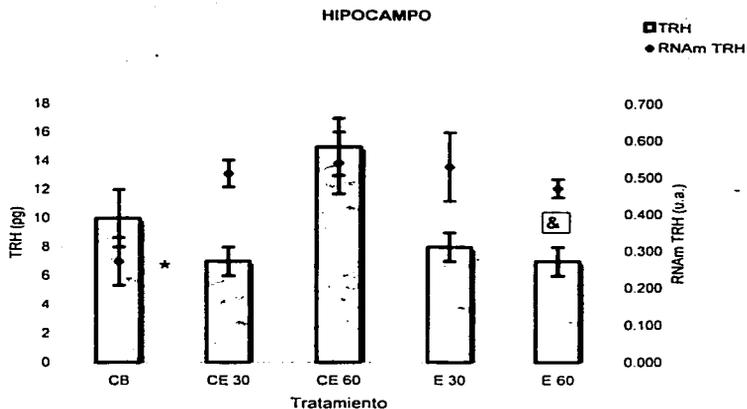
Gráfica 1. Contenido de corticosterona sérica de todos los grupos. Grupos de 8 ratas –a menos que se indique lo contrario– sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E) y sacrificadas 30 ó 60 min después. ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa con $p < 0.05$. E 30 (823.71 ± 149.17 ng/ml Cort.) (media \pm error estándar de la media; $\bar{X} \pm$ E.S.M.) es significativamente diferente de CB * (529.75 ± 55.34); de CE 60 ** (469.75 ± 52.69) y de E 60 *** (378 ± 55.91).



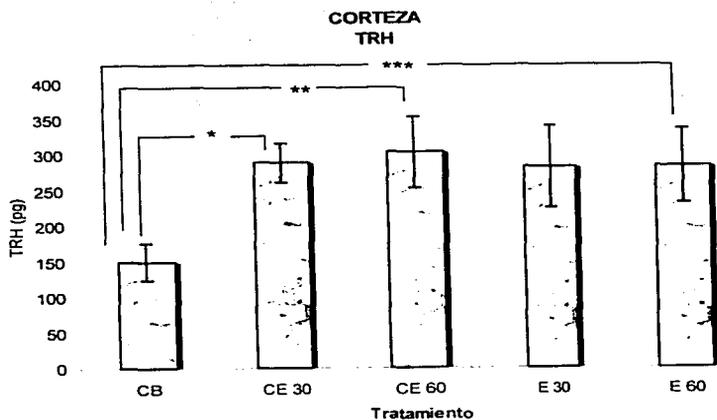
Gráfica 2. Niveles de TRH y RNAm de Pro-TRH en Hipotálamo. Grupos de 8 ratas –a menos que se indique lo contrario– sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10 min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E). ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa cuando $p < 0.05$. El ANOVA de TRH ($F = 6.592$) mostró que CE-30 (403 ± 77 pg de TRH) es diferente significativamente a todos los grupos*. ANOVA de RNAm de Pro-TRH ($F = 2.433$) mostró que E 60 (0.830 ± 0.140 densidad relativa de DNAc de proTRH/G3PDH; unidades arbitrarias –u.a.–) es significativamente diferente de CB * (0.375 ± 0.100); de CE 30 ** (0.222 ± 0.039); y de E 30 *** (0.080 ± 0.033).



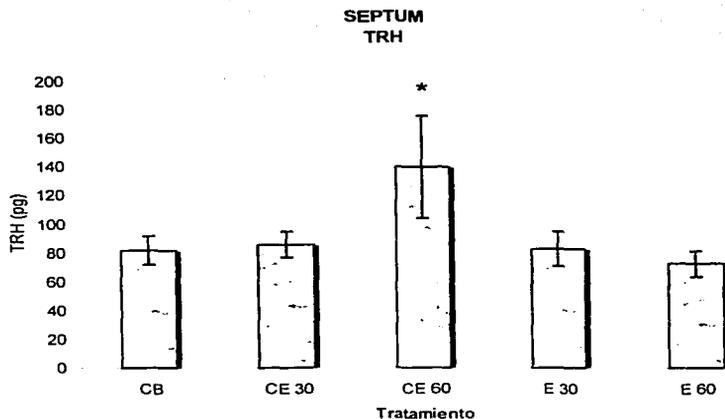
Gráfica 3. Niveles de TRH y RNAm de TRH en Amígdala. Grupos de 8 ratas –a menos que se indique lo contrario– sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E). ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa cuando $p < 0.05$. El ANOVA de TRH ($F = 3.825$) mostró que E 30 (403 ± 61 pg de TRH) es significativamente diferente de todos los grupos *. El ANOVA de RNAm de Pro-TRH ($F = 4.992$) mostró que CB (0.332 ± 0.107 u.a. de RNAm de Pro-TRH) es significativamente diferente de E30 * (0.080 ± 0.033) y de E60** (0.082 ± 0.021); además, E30 es significativamente diferente de CE 30 # (0.222 ± 0.039).



Gráfica 4. Niveles de TRH y RNAm de proTRH en Hipocampo. Grupos de 8 ratas –a menos que se indique lo contrario– sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E). ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa cuando $p < 0.05$. El ANOVA de TRH ($F = 2.808$) mostró que CE 60 (7 ± 1 pg. TRH) es significativamente diferente de E 60 & (15 ± 2). El ANOVA de RNAm de Pro-TRH ($F = 3.103$) mostró que CB (0.272 ± 0.064) es diferente de todos los grupos *.

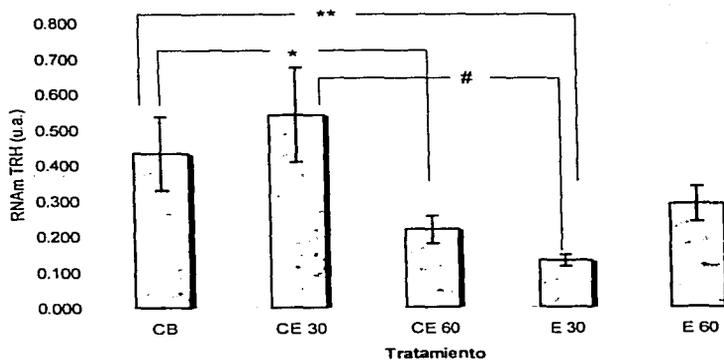


Gráfica 5. Contenido de TRH en Corteza Frontal. Grupos de 8 ratas —a menos que se indique lo contrario— sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E). ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa cuando $p < 0.05$. El ANOVA de TRH ($F = 1.871$) mostró que CE 30 * (289 ± 27 pg de TRH), CE 60 ** (304 ± 50) y E60 ** (284 ± 52) son significativamente diferentes de CB (150 ± 26).



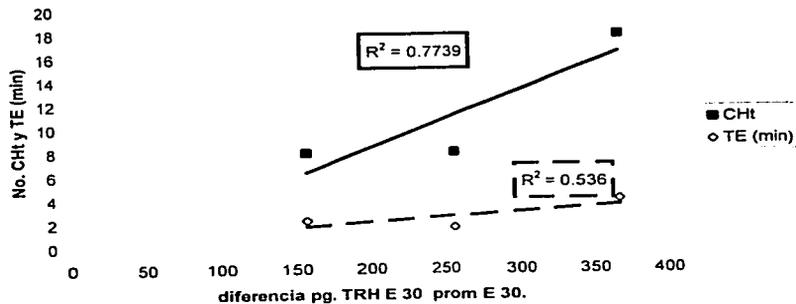
Gráfica 6. Contenido de TRH en *Septum*. Grupos de 8 ratas –a menos que se indique lo contrario- sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E). ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa cuando $p < 0.05$. El ANOVA mostró que CE 60 (140 ± 36 pg de TRH) es significativamente diferente a todos los grupos *.

NÚCLEO ACCUMBENS RNAm TRH



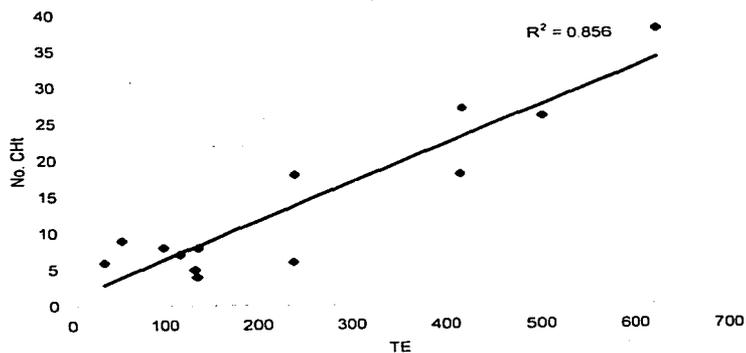
Gráfica 7. RNAm de TRH en Núcleo Accumbens. Grupos de 8 ratas –a menos que se indique lo contrario- sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CB); expuestas a la cámara sin electrodo, por 10min (CE) y sacrificadas 30 ó 60 min después; expuestas a la cámara con electrodo (E). ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa cuando $p < 0.05$. El ANOVA de RNAm Pro-TRH ($F = 4.069$) mostró que CB (0.431 ± 0.133 u.a. RNAm Pro-TRH) es significativamente diferente de CE 60 * (0.218 ± 0.038) y de E 30 ** (0.131 ± 0.016); además, CE 30 (0.541 ± 0.133) es significativamente diferente de E 30 #.

Amígdala
TRH y Parámetros del Comportamiento
Grupo de 30 minutos



Gráfica 8. Análisis de Correlación (mínimos cuadrados) entre el aumento de TRH en amígdala (diferencia pg. TRH E 30 prom E 30), el número total de choques recibidos y el tiempo de enterramiento.

Correlación entre Tiempo de Enterramiento y Número Total de Choques



Gráfica 9. Análisis de Correlación (mínimos cuadrados) entre tiempo de enterramiento y número de choques totales recibidos. $n = 13$. Coeficiente de correlación $R^2 = 0.856$.

Tabla 1. Parámetros del comportamiento de la prueba de Enterramiento Defensivo.

Grupo (Rata No.)	No. Choques Totales	No. de Choques ANTES/DESPUÉS de empezar a enterrar	Latencia al Enterramiento (LE) (seg)	Tiempo de Enterramiento (TE) (seg)	No. de exploraciones al aire	No. De exploraciones al electrodo.
E 30 (1)	6	4/2	36	35	23	7
E 30 (2)	9	3/6	41	55	15	5
E 30 (3)	18	3/15	43	418	16	5
E 30 (4)	8	5/3	49	100	19	5
E 30 (5)	27	2/25	24	422	13	8
E 30 (6)	18	3/15	27	242	16	8
E 30 (7)	8	3/5	31	137	24	13
E 60 (1)	6	3/3	43	239	28	5
E 60 (2)	7	3/4	22	118	21	5
E 60 (3)	4	1/3	41	136	12	6
E 60 (4)	38	2/36	9	630	11	11
E 60 (5)	26	5/21	22	506	13	4
E 60 (6)	5	2/3	17	134	30	10

VII. DISCUSIÓN

La corticosterona aumentó sólo en el grupo experimental E 30; si bien hay un ligero aumento ($22 \pm 10 \%$) en CE 30, éste no es significativo. El tiempo de exposición a la caja experimental es de 10 min, resulta evidente que a los 60 min los animales se han recuperado del estrés pues los niveles de corticosterona son equivalentes al control basal. Como se mencionó, los animales fueron habituados por dos días previos a la experimentación; el haberlos introducido nuevamente a la caja no causó estrés adicional si bien, los animales exploran la caja y se mueven con mayor facilidad ya que están solos, lo que significa un cambio en el ambiente. Por ello, se hacen las comparaciones contra el control basal así como entre el control experimental contra el grupo que estuvo expuesto al electrodo.

Los cambios en contenido de la TRH y niveles de su RNAm variaron dependiendo de la región estudiada. En el hipotálamo (gráfica 2), hubo aumento de contenido de la TRH en el grupo CE 30 y el RNAm de Pro-TRH aumentó significativamente en el grupo E 60. En amígdala (gráfica 3), el único cambio significativo, en contenido de la TRH, se detectó en E 30 mientras que en este grupo y en E 60, los niveles de RNAm de Pro-TRH son significativamente menores (vs basales y vs CE 30). Los grupos experimentales de esta región presentan niveles similares a los basales. En el hipocampo (gráfica 4), la disminución de contenido de la TRH en el grupo E 60 al compararlo con CE 60, resultó significativa; el RNAm de Pro-TRH es significativamente mayor en todos los grupos – respecto a valores basales- sin haber diferencias entre ellos. En la corteza (gráfica 5), la concentración de la TRH de todos los grupos es significativamente mayor respecto a la basal pero no hay diferencias entre ellas. En el septum (gráfica 6), hubo aumento de contenido de TRH en CE 60 y en el núcleo accumbens (gráfica 7) el RNAm de Pro-TRH disminuyó en CE 60 y en E 30 (vs niveles basales y vs CE 30).

El contenido de la TRH, en un momento determinado, es la resultante de procesos de biosíntesis, degradación intracelular y liberación. Se ha demostrado que las enzimas citosólicas que degradan a la TRH no están sujetas a regulación y, al menos que por algún un proceso patológico el péptido se libere de la vesícula al interior de la célula, las peptidasas no tienen acceso a al TRH. La inactivación iextracelular (por la PPII) del péptido liberado si pudiera estar regulada pero la proporción de TRH endógeno es baja ya

que, además, difunde por el espacio extracelular. Por tanto, cambios en el contenido tisular reflejarán, principalmente, cambios en biosíntesis y liberación.

No se han hecho experimentos de pulso y caza, que indiquen el tiempo que tardaría un aumento en los niveles de RNAm en reflejarse en aumento de concentración de TRH (que como se mencionó es sintetizado como una proteína de alto peso molecular que se procesa a TRHgly para luego ser convertido en TRH). Evidencias con otros péptidos, y en células en cultivo hacen suponer que el tiempo mínimo para ver un aumento es de 2 h.

A los tiempos utilizados en este trabajo (30 y 60 min) proponemos que los cambios en concentración de TRH son debidos a aumento o disminución en la liberación o posible efecto en PAM que active la conversión de TRHgly a TRH.

En respuesta a un estímulo neural como la exposición al frío, que activa el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo o, la succión de las crías (que causa una liberación en prolactina) los niveles de RNAm de Pro-TRH aumentan en forma rápida y transitoria (60 y 30 min respectivamente) [Uribe *et al.*, 1991]. En el sistema límbico, la estimulación eléctrica subumbral de la amígdala, incrementa los niveles de RNAm de Pro-TRH y se presentan cambios en el contenido de TRH que correlacionan con la actividad epileptogénica de las regiones [de Gortari *et al.*, 1998. Esto nos permite postular que las alteraciones en los niveles TRH ó de su RNAm representan una respuesta de activación de las neuronas TRHérgicas ante un estímulo.

Hipotálamo. (gráfica 2)

A los 30 min el contenido de la TRH aumenta significativamente en el grupo habituado por tercer día consecutivo (CE 30) mientras que la síntesis de RNAm Pro-TRH no se modifica. Inversamente, en los grupos experimentales, el contenido de la TRH regresa a niveles basales, disminuyendo en el grupo E 60 comparado a todos los otros grupos y con un aumento significativo en la síntesis de pro-TRH. En el primer caso -grupo CE 30-, el aumento en contenido de la TRH ocurre en respuesta al reconocimiento del ambiente que propicia la exploración y el movimiento, aunque es importante subrayar la reversibilidad de este efecto pues, al comparar E 60 con CB, los contenidos de TRH son prácticamente idénticos. El aumento pudiera deberse a una inhibición temporal en la liberación del péptido, ó a un aumento en el procesamiento (TRH-gly-TRH) que se normaliza a los 60 min. En el grupo sometido al modelo de ansiedad y sacrificado 60 min después, parece haber un aumento en la liberación de TRH pues el contenido del péptido es el menor de

todos los grupos y, además, coincide con los niveles más altos de RNAm de Pro-TRH, sugiriendo un aumento en la síntesis de Pro-TRH. Estos resultados muestran que las neuronas TRHérgicas del hipotálamo se activan en respuesta a los choques eléctricos. El hipotálamo es la región cerebral en donde se concentra la mayor cantidad de TRH en el SNC [Lechan, 1986], es también el sitio de regulación neuroendócrina más importante [Heisenlender., *et al.*, 1992] y proyecta terminales TRHérgicas a regiones límbicas del SNC. Estos resultados permiten definir que la vía TRHérgica de ésta región es activada durante el modelo de ansiedad de enterramiento defensivo; sin embargo, la inhibición de la liberación en los animales habituados pudiera representar un efecto por el estado de alerta o el aumento en el movimiento debido al reconocimiento de ambiente. La activación del TRH hipotalámico puede estimular al eje tiroideo o activar las vías TRHérgicas no hipofisiotrópicas por medio de sus conexiones con otros núcleos cerebrales. En este trabajo, no es posible diferenciar estas dos posibles acciones del TRH hipotalámico, para poder hacerlo, sería necesario cuantificar, por ejemplo, la concentración de TSH como posible marcador de la activación del TRH hipofisiotrópico.

Amígdala (gráfica 3)

Responde específicamente al modelo de ansiedad: sólo se observan cambios en el contenido de la TRH en uno de los grupos experimentales y ambos grupos (experimentales) presentaron disminución en niveles del RNAm. La TRH, que aumentó a los 30 minutos después de la prueba, parece ser liberada en los 30 min siguientes ya que el grupo E 60 presenta contenido de TRH equivalente al basal. Lo anterior implicaría que habría una acumulación del péptido a los 30 min que concurda con los niveles más bajos del RNAm y posteriormente, ocurriría su liberación. Cabe señalar que el aumento en TRH en respuesta a los choques eléctricos es reversible. La síntesis de Pro-TRH disminuye significativamente en los dos grupos experimentales. Es decir, que en el momento tanto de la acumulación del péptido como en el de la liberación, la síntesis se encuentra disminuida respecto a los niveles basales. En los experimentos realizados, la respuesta ansiosa del animal parece inhibir a la TRH de la amígdala. En los desórdenes de ansiedad, esta región se activa, otorgando significado emotivo a las experiencias y estímulos que el animal percibe y también se encuentra activada ante situaciones donde se experimenta miedo [Clement y Chapouthier, 1998]. Esta activación ocurre por medio de gran cantidad de vías de neurotransmisión, dentro de las que se encuentran: la serotoninérgica, la noradrenérgica, la de los opioides edógenos, y la del estrés [Charney,

1996] entre otras. Por lo anterior, resulta muy sugerente el que la viáde la TRH amigdalina esté inhibida de manera específica al modelo de enterramiento defensivo, ya que se ha demostrado su interacción con vías de neurotransmisión involucradas en la ansiedad: colocaliza con serotonina en otras regiones del sistema nervioso [Heuer, H., *et al.* , 2000], interactúa con la noradrenalina y su síntesis es afectada por los corticosteroides [Kakucska y Lechan, 1995]. Con los resultados obtenidos a partir de este trabajo, no es posible establecer las vías de interacción precisas entre el TRH y otros neurotransmisores, sin embargo, se sientan las bases para futuros estudios específicos en la amígdala, sobre el TRH y la ansiedad. Sería necesario medir directamente la liberación del péptido para saber a qué se debe el aumento en contenido de TRH, pues éste podría resultar también de un aumento en la conversión TRHgly-TRH o de la inhibición de su degradación. Además, para poder concluir el carácter de este péptido en la amígdala, es necesario saber con certeza la relación entre el TRH y otros neurotransmisores en las condiciones establecidas, ya que los efectos de esta molécula sobre éstos pueden ser tanto inhibidores como excitadores de vías que, a su vez, produzcan o inhiban comportamientos ansiosos. Si el aumento en contenido de la TRH en la amígdala se debiera a una inhibición de la liberación, entonces parecería ser un agente inhibidor en las conductas de ansiedad.

Existió una tendencia en los animales que presentaron mayor contenido de la TRH en la amígdala puesto fueron también los que recibieron más choques durante la prueba (gráfica 8). Ya que existe una correlación significativa entre el número de choques recibidos y el tiempo de enterramiento (gráfica 9), se podría esperar que la tendencia también se observara con este último parámetro. Desgraciadamente, ya que sólo se cuenta con tres datos para realizar las correlaciones conductuales (durante el RIA, la concentración de TRH excedió los límites de sensibilidad del protocolo) no es posible inferir un papel directo de la TRH amigdalina en la conducta de enterramiento defensivo.

Hipocampo (gráfica 4)

La síntesis de la TRH aumentó significativamente en los grupos controles experimentales y en los experimentales, indistintamente. Parece ser que el reconocimiento y la exploración activaron *per se* la síntesis en la misma magnitud en la que lo hizo el modelo de ansiedad. El contenido de la TRH fue equivalente a niveles basales en todos los grupos, aunque al comparar el grupo E 60 con el CE 60, existió una disminución

significativa. El hipocampo es una región que está involucrada en el reconocimiento espacial de ambientes novedosos; recibe estímulos de las cortezas sensoriales y regresa esta información a la corteza frontal para su almacenamiento más permanente [Charney y Bremner]. Juega un papel muy importante en los desórdenes de ansiedad pero pareciera que la TRH de esta región no participa en estas respuestas, por lo menos en lo que al modelo de enterramiento defensivo se refiere. La TRH del hipocampo parece más bien provocar un aumento en el estado de alerta. Existen evidencias que involucran al TRH y al hipocampo con efectos que estimulan el estado de alerta [Arnold., 1991; Nishino., 1997] por lo que es posible que los cambios observados en esta región respondan a un estado de alerta aumentado que no está relacionado con la ansiedad. Sería necesario saber si la disminución de TRH entre CE 60 y E 60 se puede atribuir al modelo de ansiedad, aunque al existir un aumento indistinto en los niveles de RNAm de Pro-TRH en todos los grupos, parece que la vía TRHérgica del hipocampo no se activa en respuesta a los choques eléctricos del modelo de enterramiento defensivo.

Corteza (gráfica 5)

Presenta concentraciones más altas de TRH en todos los grupos respecto al contenido basal, es decir, que el estímulo del reconocimiento del ambiente y el del modelo de ansiedad aumentan indistintamente el contenido de TRH. La corteza participa en el reconocimiento y establecimiento de memorias espaciales y emocionales [Charney y Bremner], sin embargo, no ha sido involucrada directamente con la ansiedad. A partir de los resultados obtenidos, no es posible diferenciar los efectos de la caja de experimentación de los de la prueba conductual. Quizá el estímulo aversivo del choque eléctrico no es lo suficientemente fuerte o duradero para causar alteraciones en la vía TRHérgica de la corteza frontal que sean diferenciables de las que estimula un ambiente semi-novedoso y propicio para la exploración. Como se mencionó, bajo condiciones normales, no se detecta RNAm de Pro-TRH en esta región y tampoco durante la estimulación por los choques eléctricos de este modelo. Estos resultados concuerdan con la literatura en donde no se ha reportado la participación directa de la corteza en la ansiedad. En conclusión, la TRH de la corteza no parece estar relacionado con la ansiedad.

Septum. (gráfica 6)

Está involucrado importantemente en la ansiedad y en particular, ha sido demostrada su

participación en el modelo de enterramiento defensivo [López-Rubalcava. , *et al.* , 2000; Degroot. , *et al.* 2001]. El grupo CE 60 responde al ambiente novedoso y no a la prueba conductual, sin embargo esta respuesta se suprime ante el estímulo aversivo de los choques (ya que E 60 tiene un valor de contenido de TRH equivalente al grupo basal); los choques evitan una respuesta que ocurre a los 60 min. El TRH en esta región, proviene principalmente del hipotálamo, en cuanto a sus funciones fisiológicas, se sabe que es una de las áreas relacionadas con el despertar; tanto de narcosis causadas por drogas de abuso [Sharp *et al.* , 1984, Hashimoto, *et al.*, 1993], como en situaciones de hibernación [Young. , *et al.*, 1979]. La disminución observada puede deberse a un aumento en la liberación de TRH o una disminución en la tasa de conversión TRHgly-TRH pero, en cualquiera de los dos panoramas, queda establecido a partir de los resultados obtenidos que en esta región la ansiedad afecta la vía TRHérgica: el aumento de TRH en el grupo CE 60, parece una respuesta ante el ambiente semi-novedoso pero en los animales sometidos a la prueba de enterramiento defensivo esta respuesta es suprimida.

Núcleo Accumbens (gráfica 2)

La síntesis de Pro-TRH disminuye tanto por el reconocimiento del ambiente y la exploración en el grupo de 60 min y, más rápidamente –a los 30 min-, en respuesta a la prueba de enterramiento defensivo. Se conoce que el TRH en éste núcleo provoca activación motora [Miyamoto y Nagawa., 1977; Sharp., *et al.*, 1985; Shian., *et al.*, 1987] para poder involucrarlo en este modelo sería necesario contar con más indicadores de la activación de la vía TRHérgica, como contenido de TRH, actividad de la PPII y cuantificación de sus receptores. La inhibición de la síntesis en E 30 es de carácter transitorio, pues los niveles de RNAm de Pro-TRH en E 60 son equivalentes a los basales.

VIII. CONCLUSIÓN

- Los resultados obtenidos durante el estudio del metabolismo de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) en regiones límbicas relacionadas con la neurobiología de la ansiedad utilizando el paradigma experimental de Enterramiento Defensivo, sugieren que la vía TRHérgica se activa específicamente en áreas como la amígdala y el hipotálamo con un estímulo que provoca ansiedad.
- Los cambios detectados en el hipocampo, la corteza y el núcleo accumbens, relacionan más con el ambiente de la caja de experimentación, lo que apuntaría hacia la participación del TRH en estudios de alerta, aprendizaje y movimiento. Se sugiere la comparación de éstos resultados con otros paradigmas experimentales.
- En este trabajo, se presentan evidencias de la participación de las vías TRHérgicas no hipofisiotrópicas que apoyan la postulación del péptido como neuromodulador en áreas límbicas del sistema nervioso central.

IX. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados de este trabajo, se define la participación de las vías TRHérgicas de áreas límbicas ante un estímulo que produce respuestas ansiosas. En adelante, será necesario explorar otros marcadores de la vía TRHérgica para poder delimitar finamente su actividad así como las posibles interacciones con neurotransmisores que participan en la ansiedad.

Es importante establecer si los cambios observados en contenido de TRH son resultado del aumento ó disminución en su liberación o de la conversión de TRHgly a TRH. Por medio de la cuantificación por RIA de TRHgly, será posible establecer esta diferencia. Como posibles estrategias experimentales que permitan detallar la activación o inhibición de la vía TRHérgica, se encuentran la cuantificación de los receptores para la TRH (TRH R1 y TRH R2) y de la PPII.

En cuanto a los efectos que la TRH pueda tener en la ansiedad causada por este modelo, será de gran utilidad llevar a cabo inyecciones de oligonucleótidos que inhiban la traducción del RNAm de la TRH, de sus receptores o de la PPII-en regiones como el hipotálamo, la amígdala y el septum que inhiban la vía de transmisión TRHérgica. Bajo estas condiciones, se someterían a los animales a la prueba de ansiedad y se cuantificarían los parámetros conductuales del modelo de enterramiento defensivo. La manipulación farmacológica de otros sistemas de neurotransmisión (por medio del uso de agonistas y/o antagonistas) establecería posibles interacciones del péptido con otras vías de comunicación neuronal.

En cuanto al diseño experimental, en primer lugar será necesario aumentar el tamaño de muestra, para garantizar confiabilidad en las inferencias estadísticas que resulten del análisis de los datos. Además, se deberá incluir un grupo intacto como control externo. Como observamos que los cambios detectados eran reversibles y ocurrían en diferentes momentos dependiendo de la región estudiada, la inclusión de nuevos grupos que sean sacrificados a los 15 min, a las 2 h y a las 24 h posteriores a la prueba, permitirá establecer si los cambios observados en los grupos experimentales permanecen o no, tiempo después de la presentación del estímulo aversivo.

X. ANEXO

Buffer RIA de TRH: fosfatos 50 mM. Fosfatos a pH 7.5 [Becker], 25% BSA, 150 mM NaOH.

Solución E para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry: 98ml. Na_2CO_3 al 2% [Sigma]: 1ml. CuSO_4 al 1% [Sigma]: 1ml. $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ 2% [Baker Analyzer].

Buffer diluyente de esteroides para el RIA de corticosterona: 50 mM de fosfato a pH 7.5 y 150 mM de NaCl [J.T. Baker].

Dilución de ^3H -Cor para el RIA de corticosterona: 1 μl de ^3H -Cor contenía 900,000 cpm se diluyó en 9 ml de amortiguador diluyente de esteroides para obtener alícuotas de trabajo que contenían 100 cpm/ μl .

Agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) [Sigma] para la extracción de RNA total: 0.1 % v/v DEPC.

Preparación de la solución D para la extracción de RNA total: 250 g tiocianato de guanidina [Sigma] disueltos en 293 ml de agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato, 17.6 ml de 0.075 M de citrato de sodio a pH 7 [J.T. Baker] y 26.4 de sarcosil al 10 %; esta solución era almacenable. El día de la extracción se añadía 350 μl de β -mercaptoetanol [Sigma] (que se mantenía a 4°C), por cada 50 ml de solución D. Se obtenía una solución de trabajo: 4M de tiocianato guanidina, 25 mM citrato de sodio a pH 7, 0.5 % sarcosil y 0.1 M β -mercaptoetanol.

Mezcla de reacción para cDNA: 8.9 H_2O + 6.0 μl de M-MLV RT 5x [Invitrogen] (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl y 15mM Mg_2Cl) + 3.0 μl de dithiothreitol (DTT) 0.1 M [Invitrogen] + 0.6 μl mezcla de deoxinucleótidos -dNTPs- 10 mM (10 mM de cada uno de los siguientes; dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro [Invitrogen]) + 1.0 μl Oligo dT 0.5

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y $0.5\ \mu\text{l}$ de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT 200 U/ μl [Invitrogen].

Mezcla de reacción para PCR: $33\ \mu\text{l}$ de H_2O bidestilada + $5\ \mu\text{l}$ de Amortiguador de Reacción 10 x (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM) [Biotecnologías Universitarias] + gelatina $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ [Gelatina de Piel de Becerro, RPI] + $1.0\ \mu\text{l}$ dNTP's 10 mM (10 mM de cada uno de los siguientes; dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro [Invitrogen]) + $1\ \mu\text{l}$ ($100\ \text{ng}/\mu\text{l}$) de oligonucleótido de iniciación *-primers-* sentido (TRH-3s 5'GGA-CCT-TGG-TTG-CTG-TCG-ACT-CTG-GCT-TTG) [IBT, UNAM] y $1\ \mu\text{l}$ ($100\ \text{ng}/\mu\text{l}$) de oligonucleótido de iniciación antisentido (TRH-4as 5'ATG-ACT-CCT-GCT-CAG-GTC-ATC-TAG-AAG-CT) [IBT, UNAM] o bien, para G3PDH, $1\ \mu\text{l}$ ($100\ \text{ng}/\mu\text{l}$) de sentido (G3PDH-1s 5' TGA-AGG-TCG-GTG-TCA-ACG-GAT-TTG-GC.) [IBT, UNAM] y antisentido (G3PDH-2as 5'CAT-GTA-GGC-CAT-GAG-GTC-CAC-CAC.) [IBT, UNAM] + $2.5\ \mu\text{l}$ Cloruro de Magnesio 30 mM [Biotecnologías Universitarias] y $0.5\ \mu\text{l}$ de la enzima Amplificasa ADN Polimerasa Termoestable (5U/ μl) [Biotecnologías Universitarias].

Electroforesis:

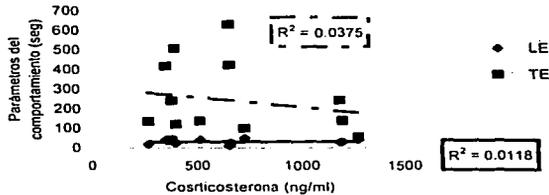
Gel de corrida: 1.7gr de agarosa [ultrapure DNA grade agarose, BioRad] diluido en 17ml de TBE 5x (54g. De Trizma base HCl electroforesis) [BioRad], 27.5 g ácido bórico y 20 ml de EDTA a pH 8.0 [BioRad], aforado a 85ml con agua destilada.

Amortiguador de corrida: TBE 0.5 x aforado con agua destilada a 750 ml (por gel).

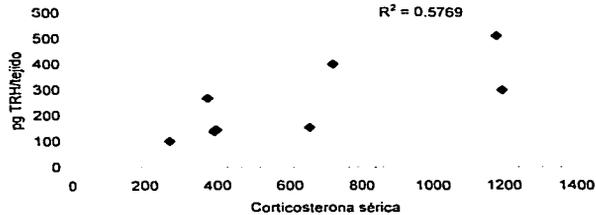
ANEXO II.

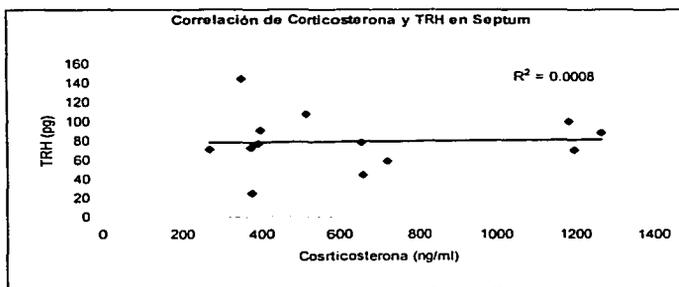
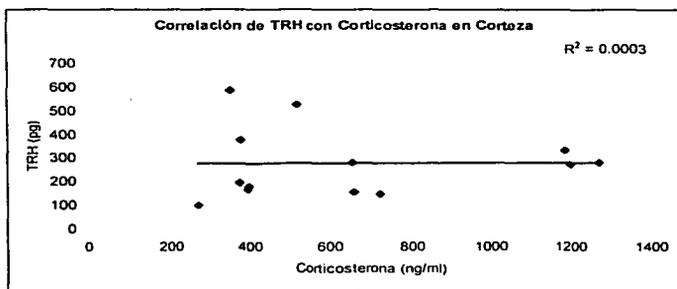
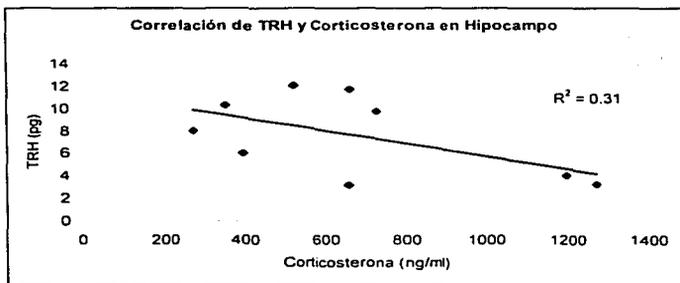
GRÁFICAS DE CORRELACIONES NO SIGNIFICATIVAS ENTRE CORTICOSTERONA Y TRH DE CADA REGIÓN. GRUPOS SOMETIDOS AL MODELO DE ANSIEDAD.

Correlación de Corticosterona con Tiempo de Enterramiento y Latencia al Enterramiento.

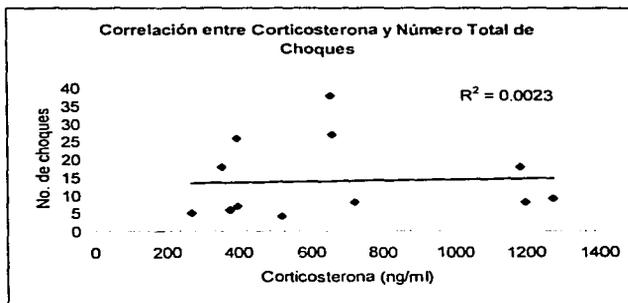
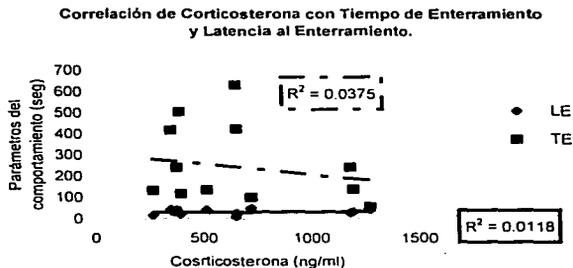


Correlación de Corticosterona con TRH en Amígdala





CORRELACIONES NO SIGNIFICATIVAS DE CORTICOSTERONA CON PARÁMETROS DEL COMPORTAMIENTO



XI. REFERENCIAS

1. Arnold R., Klingberg F., Schaker W., 1991. Systemically applied thyrotropin-releasing hormone (TRH) modifies spontaneous behaviour of rats. Biomed Biochim Acta. 50, 1217-1224
2. Ázizi F., Mannix J.E., Howard D., Nelson R.A., 1979. Effect of winter sleep on pituitary-thyroid axis in American black bear. Am J Physiol. 237, 227-230.
3. Barbee J.G., 1998. Mixed symptoms and syndromes of anxiety and depression: diagnostic, prognostic, and etiologic issues. Ann Clin Psychiatry. 10, 15-29.
4. Bauer K., 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. Biochimie. 70, 69-74.
5. Belousov A.B., Belousova V., 1993. The effect of thyrotropin-releasing hormone on the activity of the septal neurons in brain slices from hibernating and active susliks Citellus undulatus. Zh Evol Biokhim Fiziol. 29, 159-166.
6. Bhargava HN., Matwyslyn GA., 1980. Influence of thyrotropin-releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine on spontaneous locomotor activity and analgesia induced by delta 9-tetrahydrocannabinol in the mouse. Eur J Pharmacol. 68:147-154
7. Boler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C.Y., Schally A.V., 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. Biochem Biophys Res Commun. 377, 5-10.
8. Breese GR., Cott JM., Cooper BR., Prange AJ., Lipton MA., 1974. Antagonism of ethanol narcosis by thyrotropin-releasing hormone. Life Sci 14:1053-1063
9. Burgus R., Dunn T.F., Desiderio D., Guillemin R., 1969. Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the [PCA-His-Pro-NH₂ sequence]. C R Acad Sci Hebd Sciences Acad Sci D. 269, 1870-1873.
10. Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162, 156-159.
11. Clement Y., Chapouthier, G., 1998. Biological Bases of Anxiety. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 22, 623-633.

12. Coplan J.D., Lydiard R.B., 1988. Brain circuits in panic disorder. Biol Psychiatry 44, 1264-1276.
13. Charli J.L., Vargas M.A., Joseph-Bravo P., 1994. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. Neuroendocrinology. 60, 323-330.
14. Charney D.S., Deutch A., 1996. A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. Crit Rev Neurobiol. 10, 419-46.
15. de Gortari P., Fernández Guardiola A., Cisneros M., Martínez A., Joseph-Bravo P., 1995. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II during the development of amygdaloid kindling. Brain Res. 679, 144-155.
16. de Gortari P., Joseph-Bravo P., Monroy-Ruiz J, Martínez A, Cisneros M, Fernández Guardiola A. 1998 Brain thyrotropin-releasing hormone content varies through amygdaloid kindling development according to afterdischarge frequency and propagation. Epilepsia. 39, 897-903.
17. de Gortari P, Méndez M, Rodríguez-Keller I, Pérez-Martínez L, Joseph-Bravo P., 2000 (A). Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. Neurochem Int. 37, 483-496.
18. de Gortari P, Cisneros M, Medellín MA, Joseph-Bravo P., 2002. Chronic ingestion of ethanol or glucose solutions affects hypothalamic and limbic TRH metabolism in dams and their pups. Neurochem Int. 41, 237-249.
19. de Gortari P., González-Alzati, M.E., Cisneros M., Joseph-Bravo P., 2000 (B). Effect of fasting on the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. Nutritional Neuroscience. 3, 255-265
20. de Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérez-Martínez L., Joseph-Bravo P., 2000 (C). Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. Neurochem Int. 37, 483-496.
21. Degroot A., Kashluba S. y Treit D., 2001. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 69, 391-399.

22. Fernández-Guasti A. y López-Rubalcava C., 1998. Modification of the Anxiolytic Action of 5-HT_{1A} Compounds by GABA-Benzodiazepine Agents in Rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 60, 27-32.
23. Fernández-Guasti A., López-Rubalcava C. y Urbá-Holmgren R., 1996. Age-Dependent Differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT_{1A} Compounds. Developmental Psychobiology. 29, 157-169.
24. French TA., Masserano JM., Weiner N., 1993. Influence of thyro-tropin-releasing hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity. Alcohol Clin Exp Res 17:99-106.
25. Glue P., Bailey J., Wilson S., Hudson A., Nutt DJ., 1992 Thyrotropin-releasing hormone selectively reverses lorazepam-induced sedation but not slowing of saccadic eye movements. Life Sci 50:PL25-PL30.
26. Giovannini MG., Casamenti F., Nistri A., Paoli F., Pepeu G., 1991. Effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis. Br J Pharmacol 102:363-368
27. Goddard A.W., Charney D.S., 1997. Toward an integrated neurobiology of panic disorder. J Clin Psychiatry. 58, 4-11.
28. Haisenleder D.J., Ortolano G.A., Dalkin A.C., Yasin M., Marshall J.C., 1992. Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. Endocrinology. 130, 2917-23.
29. Hashimoto T., Wada T., Fukuda N., Nagaoka A., 1993 Effect of thyrotropin-releasing hormone on pentobarbitone-induced sleep in rats: continuous treatment with a sustained release injectable formulation. J Pharm Pharmacol 45:94-97
30. Heal DJ., Sabbagh A., Youdim MB., Green AR., 1981. Behavioural effects of central and peripheral injection of various analogues and metabolites of thyrotropin-releasing hormone (TRH). Neuropharmacology 20:947-957
31. Heuer H., Martin K., Shaffer H., O'Donnell D., Walker P. y Bauer K., 2000. Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. The Journal of Comparative Neurology. 428, 319-336.
32. Itoh Y., Ogasawara T., Mushiroy T., Yamazaki A., Ukai Y., Kimura K., 1994 Effect of NS-3, a thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo acetylcholine release in rat brain: regional differences and its sites of action. J Pharmacol Exp Ther 271, 884-890.

33. Inanaga K., Kumashiro H., Fukuyama Y., Ohtahara S., Shirouzu M., 1989. Clinical study of oral administration of DN-1417, a TRH analog, in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia* 30, 438-445.
34. Johnson M.R., Lydiard R.B., 1995. The neurobiology of anxiety disorders. *Psychiatr Clin North Am.* 18, 681-725.
35. Joseph-Bravo P., Charli J.L., Palacios J.M., Kordon C., 1979. Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology.* 104, 801-806.
36. Joseph-Bravo P., Uribe R.M., Vargas M.A., Pérez-Martínez L., Zoeller T., Charli J.L., 1998. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 18, 231-247.
37. Kakucska I., Qi Y., Lechan R.M., 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 136, 2795-2802.
38. Kasparov S.A., Chizh B.A., 1992. The NMDA-receptor antagonist dizocilpine (MK-801) suppresses the memory facilitatory action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuropeptides* 23:87-92
39. Koob G.F., Heinrichs S.C., 1999. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Research Interactive.* 848, 141-152.
40. Koob G.F., Heinrichs S.C. y Britton K., 1998 Chapter 6. Animal Models of Anxiety Disorders. The American psychiatric press textbook of psychopharmacology, Second Edition.
41. Korte S.M., 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 25, 117-142.
42. Lechan R.M., Toni R., 1992 Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. In: Nemeroff CB (ed) *Neuroendocrinology.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp 279-329
43. Lechan R.M., Wu P., Jackson I.M., 1986. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology.* 119, 1210-1216.
44. Lee S.I., Stewart K. y Goodman R., 1988. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 263, 16604-16609.

45. Lopez J.F., Akil H., Watson S.J., 1999. Neural circuits mediating stress. Biol Psychiatry 46, 1461-1471.
46. López-Rubalcava C., Hen R., y Cruz S.L., 2000. Anxiolytic actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT_{1A} knockout and wild-type mice. Behavioural Brain Research. 115, 85-94.
47. López-Rubalcava C., 1996. Pre- or post activity of 5-HT_{1A} Compounds in mice depends on the anxiety paradigm. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 54, 677-686.
48. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., y Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193, 265-275.
49. Magarinos A.M., Orchinik M., McEwen B.S., 1998. Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. Brain Res.809, 314-318.
50. McEwen B.S. y Magarinos A.M., 1997. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. Ann N Y Acad Sci. 821, 271-284.
51. Menard J., y Treit D., 2001. The anxiolytic effects of intra-hippocampal midazolam are antagonized by intra-septal L-glutamate. Brain Research. 888, 163-166.
52. Mendez M., Joseph-Bravo P., Cisneros M., Vargas M.A., Charli J.L., 1987 Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. Peptides 8, 291-298.
53. Metcalf G., Dettmar P.W., 1981 Is thyrotropin-releasing hormone an endogenous substance in the brain? Lancet 1:586 -589.
54. Miyamoto M., Nagawa Y., 1987 Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone(TRH) in rats. Eur J Pharmacol 44:143-152
55. Nillni E.A. y Sevarino K. A., 1999. The Biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone-Derived Peptides. Endocrine Reviews. 20, 599-648.
56. Ninan P.T., 1999. The functional anatomy, neurochemistry, and pharmacology of anxiety. J Clin Psychiatry. 60, 12-17.
57. Nutt D.J., Bell C.J., Malizia A.L., 1998. Brain mechanisms of social anxiety disorder. J Clin Psychiatry. 59, 4-11.
58. Ogasawara T., Itoh Y., Tamura M., Ukai Y., Yoshikuni Y., Kimura K., 1996. NS-3, a TRH-analog, reverses memory disruption by stimulating cholinergic and noradrenergic systems. Pharmacol Biochem Behav 53:391-399

59. O'Leary R y O'Connor B., 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone. J.Neurochem. 65 953-963.
60. Paxinos G. y Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th Edition. Academic Press Inc. San Diego, California. pp. 4-5, 9-17, 23-47, 80-116.
61. Rosen J.B., Cain C.J., Weiss S.R., Post R.M., 1992 Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin-releasing hormone during amygdala kindling: an *in situ* hybridization study. Brain Res Mol Brain Res 15, 247-255.
62. Rosen J.B., Kim S.Y., Post R.M., 1994 Differential regional and time course increases in thyrotropin-releasing hormone, neuropeptide Y and enkephalin mRNAs following amygdala kindled seizure. Brain Res Mol Brain Res. 27, 71- 80.
63. Sajdyk T.J., Shober D.A., Gehlert D.R. y Shekhar A., 1999. Role of corticotropin-releasing factor and uocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses. Behavioural Brain Research. 100, 207-215.
64. Sattin A., 1987. A possible role for thyrotropin releasing hormone (TRH) in antidepressant treatment. Adv Exp Med Biol. 221,549-55.
65. Sharp T, Tulloch IF, Bennett GW, Marsden CA, Metcalf G, Dettmar. 1984. Analeptic effects of centrally-injected TRH and analogues of TRH in the pentobarbitone-anaesthetized rat. Neuro-pharmacology 23:339 -348
66. Shian LR., Wu MH., Lin MT., Ho LT., 1985. Hypothalamic involvement in the locomotorstimulant or satiety action of thyrotropin-releasing hormone and amphetamine. Pharmacology 30:259 -265.
67. Stahl C.E., Redei E., Wang Y., Borlongan, C.V., 2002. Behavioral, hormonal and histological stress markers of anxiety-separation in postnatal rats are reduced by prepro-thyrotropin-releasing hormone 175-199. Neurosci Lett: 321, 85-89.
68. Strand F.L., Neuropeptides. Regulators of Physiological Processes. 1999. MIT Press. Cambridge, Massachusetts. pp 179-185.
69. Sullivan G.M., Coplan J.D., Gorman J.M., 1998. Psychoneuroendocrinology of anxiety disorders. Psychiatr Clin North Am. 21, 397-412.
70. Tache Y., Lis M., Collu R., 1977 Effects of thyrotropin-releasing hormone on behavioral and hormonal changes induced by b-endorphin. Life Sci 21:841- 846
71. Takeuchi Y., Tominaga M., Mitsufuji N., Yamazoe I., Kawase S., Nishimura A., Matsuo S., Sawada T., 1995 Thyrotropin-releasing hormone in treatment of intractable epilepsy: neurochemical analysis of CSF monoamine metabolites. Pediatr Neurol. 12,139 -145.

72. Tanaka M., Yoshida M., Emoto H. y Ishii H., 2000. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. European Journal of Pharmacology. 405, 397-406.
73. Thase MH., Dube S., Boeler K., Howland RH., Myers JE., Friedman E., Jarrett DB., 1996. Hipotalamic-pituitary-adrenocortical activity and response to cognitive behavior therapy in unmedicated, hospitalized depressed patients. Am J Psychiatry 153, 886-8-91
74. Treit, D. 1989. A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolytics. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 36, 203-205.
75. Treit, D., Pinel, J.P.J. y Fibiger, H.C. 1981. Conditioned defensive burying: a newparadiqm for the study of anxiolytic agents. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 15, 619-626.
76. Uribe RM., Joseph-Bravo P., Pasten J., Mendez M., Covarrubias L., Charli JL., Some event of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. Neuroendocrinology 1991. 54:493-8.
77. Weiss S. y Uhde T., 1990. Chapter 1. Animal Models of Anxiety. Neurobiology of Panic Disorder. pp. 3-27.
78. Yamada M., Radovick s., Wondisfor R. E., Kakajawa y., Weingraub B.D., y Wilber J.F., 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing-hormone. Mol. Endocrinol. 4, 551-556.
79. Young R.A., Robinson D.S., Vagenakis A.G., Saavedra J.M., Lovenberg W., Krupp P.P., Danforth E. Jr., 1979 Brain TRH, monoamines, tyrosine hydroxylase, and tryptophan hydroxylase in the woodchuck, Maromota monax, during the hibernation season. Comp Biochem Physiol C. 63C, 319-323.
80. Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R., 1999. Fundamental Neuroscience. Academic Press. San Diego, California. pp 193-265, 1127-1137, 1434-1438.