

03086

1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Regulación de Ectopeptidasas en el Sistema Nervioso Central

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS  
FISIOLOGICAS

P r e s e n t a.

PATRICIA DE GORTARI GALLARDO

México D.F.

~~2023~~  
2023

1



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

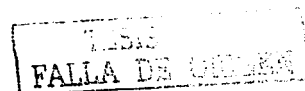
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

## INDICE GENERAL

Autoriza a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo intelectual.  
NOMBRE: PATRICIA BEJINANO -  
DIRI DE GUATEMALA CALLEADO  
FECHA: 06/10/2003  
FIRMA: Patricia de Guate y



### Página

I. INTRODUCCION.....	1
I.1. Antecedentes del TRH.....	3
I.2. Síntesis del TRH.....	3
I.3. Regulación del metabolismo del TRH en el eje neuroendócrino..	5
I.3.1. Inactivación del TRH.....	6
I.3.1.1. Regulación de la enzima PPII en la adenohipófisis.....	8
I.4. Regulación del metabolismo del TRH en el SNC.....	9
I.4.1. Localización del pro-TRH.....	9
I.4.2. Efectos celulares del TRH en el SNC.....	11
I.4.3. Inactivación del TRH en el SNC.....	14
I.5. TRH como neuromodulador.....	16
I.5.A. Inyección intraperitoneal de etanol como modelo de modifica- ción de la transmisión TRHérgica.....	18
I.5.A.1. Interacción entre el TRH y el etanol.....	20
II.A. OBJETIVOS.....	22
I.5.B. Kindling amigdalino como modelo de activación de la vía TRH- érgica.....	22
I.5.B.1. Kindling amigdalino como modelo de epilepsia.....	22
I.5.B.2. Cambios moleculares y celulares durante el kindling.....	23
I.5.B.3. Mecanismos bioquímicos involucrados.....	24
I.5.B.4. TRH y epilepsia.....	27

TESIS CON  
FALLA DE CREDITO

	<b>Página</b>
I.5.B.5. TRH y kindling amigdalino.....	29
II.B. OBJETIVOS.....	32
III. JUSTIFICACION.....	32
IV. METODOLOGIA.....	33
V. RESULTADOS.....	47
VI. DISCUSION.....	55
VII. CONCLUSIONES.....	66
VIII. REFERENCIAS.....	67

## I. INTRODUCCION

La neurobiología estudia la interacción de las neuronas que promueven conductas en los organismos complejos y en las células individuales. Este objetivo ha llevado a los científicos a identificar las moléculas que determinan las propiedades de las células, las que hacen posible su comunicación, las que permiten conexiones correctas entre ellas, así como las que organizan y descifran la información que le llega a la célula, para que ésta la integre y presente una conducta determinada como respuesta al estímulo específico (Hall 1992). Entre estas moléculas se encuentran los denominados neurotransmisores clásicos (derivados de aminoácidos), responsables de los sistemas rápidos de comunicación sináptica (milisegundos) y, los neuropéptidos quienes efectúan la transmisión de una forma más lenta que los primeros (centenas de milisegundos). Estos, liberados en las sinapsis hacen posible la comunicación celular. Pueden actuar a través de la alteración intracelular de mensajeros químicos, inducir cambios en la expresión genética, en el número y cinética de canales iónicos, en la sensibilidad celular a voltaje, produciendo diferencias en la excitabilidad de las neuronas que puede ser transitoria o duradera (Hall 1992). En las vías de comunicación tanto de neurotransmisores como neuropéptidos, las vesículas secretoras son el medio por el cual los mensajeros químicos se seleccionan, viajan hasta el sitio de liberación y se secretan por exocitosis.

Se conocen en la actualidad alrededor de 40 neuropéptidos (Tabla 1). Algunos de ellos fueron identificados por su acción en tejidos diferentes al Sistema Nervioso Central (SNC). Estudios de inmunohistoquímica revelaron que las terminales sinápticas que contienen neuropéptidos también pueden contener vesículas con neurotransmisores clásicos, así como colocación de dos péptidos en la misma neurona. La Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH) es uno de los péptidos que originalmente se encontraron en el hipotálamo y que regulan desde ahí la secreción glandular.

El TRH se sintetiza en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo y regula el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) para controlar la degradación de las reservas energéticas de los animales, dependiendo de las necesidades diarias, que varían con las estaciones, con la edad reproductiva, con las condiciones ambientales (frío, estrés) etc. Pero también se encuentra en regiones extrahipotálámicas que lo han implicado en funciones biológicas no relacionadas con su papel de neurohormona, como la regulación de la motilidad gástrica, del ritmo cardíaco, la regulación del apetito, el despertar y también parece participar en desórdenes como la epilepsia y puede bloquear el efecto de algunos narcóticos como el etanol.

**Tabla 1. Péptidos en el cerebro de mamíferos.** Hall Z., *Molecular Neurobiology*, 1992

<p><i>Hormonas liberadoras hipotalámicas</i></p> <p>Hormona liberadora de la Tirotrópina (TRH)</p> <p>Hormona liberadora de la Gonadotropina (GnRH)</p> <p>Somatostatina (SRIF)</p> <p>Factor de liberación de la Corticotropina (CRF)</p> <p>Hormona liberadora de la Hormona del crecimiento (GHRH)</p> <p>Hormona liberadora de la Hormona luteinizante (LHRH)</p> <p><i>Péptidos adenohipofisarios.</i></p> <p>Hormona adrenocorticotrópica (ACTH)</p> <p>Hormona del crecimiento (GH)</p> <p>Lipotropina</p> <p>Hormona estimuladora de los <math>\alpha</math>-melanocitos (<math>\alpha</math>-MSH)</p> <p>Prolactina</p> <p>Hormona luteinizante</p> <p>Tirotrópina.</p> <p><i>Hormonas neurohipofisarias.</i></p> <p>Vasopresina</p> <p>Oxitocina</p> <p>Neurofisinas</p> <p><i>Hormonas circulatorias</i></p> <p>Angiotensina</p> <p>Calcitonina</p> <p>Glucagon.</p>	<p><i>Péptidos gástrica cerebrales</i></p> <p>Péptido intestinal vasoactivo (VIP)</p> <p>Colocecistoquinina (CCK)</p> <p>Gastrina</p> <p>Motilina</p> <p>Polipéptido pancreático.</p> <p>Secretina</p> <p>Sustancia P</p> <p>Sustancia K</p> <p>Bombesina</p> <p>Neurotensina</p> <p>Péptido de liberación gástrica (GRP)</p> <p><i>Péptidos Opioides</i></p> <p>Dinorfina</p> <p><math>\beta</math>-endorfina</p> <p>Met-enkefalina</p> <p>Leu-enkefalina</p> <p><i>Otros</i></p> <p>Ibuidiquinina</p> <p>Carosina</p> <p>Neuropeptido Y</p> <p>Factor de crecimiento epidérmico</p> <p>Galanina</p> <p>Factor natriurético atrial (ANF).</p>
---	--

La participación del TRH en la comunicación celular y en el mantenimiento de funciones biológicas involucra diferentes eventos metabólicos: su síntesis, su transporte hacia la terminal nerviosa, su procesamiento, liberación hacia el espacio intersináptico y finalmente su degradación.

La caracterización de cada uno de estos eventos del metabolismo de TRH y la identificación de los factores que los regulan abre la posibilidad de conocer cómo el organismo se adapta a diferentes estímulos favorables o adversos para su supervivencia. Al mismo tiempo, permite entender cómo la alteración de alguno de los eventos del metabolismo de ciertos péptidos pueden estar involucrados en disfunciones cerebrales tales como la epilepsia.

El objetivo del trabajo se centra en el evento de degradación del TRH, una vez que éste ha sido liberado en la intersinapsis; específicamente la regulación de la actividad y de la expresión de su enzima degradativa: la piroglutamil peptidasa II (PPII).

La estrategia utilizada en el presente trabajo, fue estudiar dos modelos de activación de las neuronas TRHérgicas en el SNC. **El kindling amigdalino y la inyección intraperitoneal de etanol**

### 1.1. Antecedentes del TRH.

La secreción de las hormonas de la hipófisis anterior está regulada por células neurosecretoras del hipotálamo. Los axones de estas células terminan en la eminencia media, de donde se secretan factores de liberación u hormonas a un sistema especial de capilares que están conectados por un sistema portal a la hipófisis anterior. En función de esta conexión "directa", los factores de liberación llegan a la hipófisis antes de que se diluyan en la circulación general. Los factores pueden estimular o inhibir la liberación de hormonas específicas de la hipófisis anterior. Puesto que se liberan muy cerca de su sitio de acción, se requieren sólo pequeñas cantidades de éstos por lo que su aislamiento e identificación necesitó de esfuerzos prolongados.

Durante 10 años dos laboratorios, uno dirigido por Roger Guillemin (*Burgus 1969*) y otro por Andrew Schally (*Boler 1969*) analizaron tejido hipotalámico para purificar el primero de estos factores, la Hormona Liberadora de la Tirotrópina (TRH), cuyo efecto sobre la liberación de tirotrópina en la adenohipófisis provocó el interés en su aislamiento y estudio. Análisis extensivos y los avances en la química de péptidos hicieron posible la caracterización de su estructura.

El TRH es un tripéptido amidado (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) ciclizado en la glutamina de su extremo N-terminal a la forma pyroGlu, y amidado en su extremo C-terminal. Las terminales de los axones que proyectan hacia la eminencia media y que liberan TRH se originan en un grupo de neuronas localizadas en el núcleo paraventricular del hipotálamo. El TRH está confinado a la división parvocelular, incluyendo las subdivisiones anterior, medial y periventricular del hipotálamo (*Lechan 1989*). Una vez liberado hacia el sistema venoso de capilares portales, tiene efecto sobre la síntesis y liberación de prolactina (*Grosvenor 1980*) en los lactotropos y sobre la tirotrópina (TSH) (*Heisenleder 1992*) en los tirotropos de la adenohipófisis. La tirotrópina a su vez, induce la síntesis y liberación de hormonas tiroideas que controlan la tasa del metabolismo.

### 1.2. Síntesis del TRH.

El mecanismo de su síntesis se determinó después de años de controversia. Ahora se sabe que el TRH resulta de la digestión postraducional de una molécula precursora de mayor tamaño. En 1986 utilizando técnicas de inmunocitoquímica y un anticuerpo dirigido contra un decapeptido sintético e hipotético pudo identificarse la presencia de un polipéptido que tiene múltiples copias de la secuencia precursora del TRH en el cerebro de rata. El aislamiento del cDNA a partir de una genoteca de expresión de hipotálamo de rata, permitió definir que éste codifica para la secuencia completa de la prohormona de TRH en mamíferos. La secuencia de aminoácidos revela que la prohormona tiene un peso



molecular de aproximadamente 26,000 daltones y contiene 5 copias de la secuencia Gln-His-Pro-Gly flanqueada por aminoácidos básicos Lis-Arg o Arg-Arg (Lechan 1986) que son secuencialmente digeridos por una convertasa (PC1 y/o PC2) y una carboxipeptidasa para originar los cinco fragmentos de Gln-His-Pro-Gly; la glutaminil ciclasa convierte la glutamina en pyroglu y una peptidilglicina- $\alpha$  amidante monooxigenasa (PAM) provoca la escisión del enlace peptídico entre la prolina y la glicina produciendo así al tripéptido funcional TRH. Además de la secuencia repetida que da lugar al TRH, la prohormona contiene cinco péptidos que separan a las péptidos de TRH flanqueados por los extremos amino y carboxilo. Ya que el péptido amino terminal también contiene un sitio de digestión potencial, siete péptidos conectores o "crípticos" que no son TRH, podrían ser generados por acción enzimática en los pares de los residuos básicos por una endopeptidasa parecida a la carboxipeptidasa B (Lechan 1992). El precursor de TRH humano contiene seis secuencias repetidas en lugar de las cinco encontradas en la rata, ambas con siete péptidos crípticos. En la rata, el péptido conector proTRH160-169 (PS4) es capaz de potenciar los efectos de TRH en la liberación de TSH de la hipófisis (Bulant 1990, Ladram 1994). La identificación de que el proTRH inmunoreactivo se encuentra confinado al soma neuronal, principalmente en el aparato de Golgi y en vesículas secretoras inmunorreactivas ha llevado a pensar que el procesamiento de la prohormona se efectúa rápidamente en la perikaria y no durante el transporte axonal tal como se ha descrito para otras prohormonas como el precursor de la vasopresina, encontrándose el péptido activo en la terminal sináptica.

El gen de TRH se ha caracterizado en la rata (Lee 1988) y en el humano (Yamada 1990) con un porcentaje de homología global de 73.3% y de 89.2% en la región que codifica para el TRH. La unidad de transcripción de ambos genes tiene tres exones separados por dos intrones. La región del extremo 5' contiene una región promotora con elementos consenso de regulación para el receptor de hormonas tiroideas (TR), dos mitades sencillas del sitio que se unen al TR en un monómero y una tercera que se une al TR en forma de homodímero así como heterodímero con proteínas auxiliares TR (Hollenberg 1995) que están relacionadas con la isoforma del receptor retinoide-X (Miyamoto 1993); un sitio consenso para la unión del receptor de glucocorticoides (GR); y dos elementos de respuesta imperfectos al AMPcíclico (cAMP) (CREs), uno de los cuales también es reconocido por el factor de transcripción AP1 y es capaz de unirse al TR $\alpha$ 1 (Lee 1988, 1993; Stevenin 1995). El exón 1 codifica para la región 5' no traducida; el exón 2, para el péptido señal y para una pequeña porción del péptido en su región aminoterminal; la mayor parte del precursor de TRH viene codificada en el tercer exón.

### 1.3. Regulación del metabolismo del TRH en el eje neuroendócrino.

El metabolismo de TRH hipotalámico debe ajustarse a las demandas energéticas del organismo durante el día, de las estaciones y, de diferentes estados fisiológicos como el crecimiento o la reproducción. En respuesta a un estímulo químico o neural, el TRH es liberado hacia el sistema portal para inducir la síntesis y liberación de tirotropina (TSH) cuya función es la de activar la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas para controlar la tasa del metabolismo y regular el gasto de la energía almacenada dependiendo de las exigencias del medio ambiente.

Entre los mensajeros químicos que regulan el metabolismo del TRH están las hormonas tiroideas T3 y T4, cuyos niveles circulantes retroalimentan al hipotálamo sobre la necesidad de acelerar o desacelerar el eje HHT. La tiroidectomía o bien un tratamiento con propiltiouracilo (PTU), eleva los niveles del RNAm de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Segerson 1987); en cambio el hipertiroidismo provoca su disminución (Koller 1987; Zoeller 1988). Este aumento en el RNAm de TRH va acompañado de un incremento en el proTRH del NPV (Segerson 1987), lo que sugiere que la traducción del RNAm del TRH también se activa. El efecto es específico para el NPV, ya que otras regiones del cerebro como el núcleo reticular ó el bulbo olfatorio no tienen respuesta.

Las hormonas tiroideas también disminuyen la densidad de los receptores a TRH en la adenohipófisis *in vivo* y en células hipofisarias en cultivo (De Lean 1977, Gershengorn 1978, Perrone 1997) disminuyendo así la respuesta a TRH. En contraste, los estrógenos incrementan los niveles del receptor de TRH *in vitro* e *in vivo* lo que eleva la sensibilidad de las células adenohipofisarias a TRH (Schomburg 1997).

La adrenalectomía induce un aumento en la síntesis de TRH hipotalámico y, la inyección de glucocorticoides (GC) en estos animales disminuye esa elevación de los niveles de su RNAm *in vivo* (Kakucska 1995). En cambio en cultivos primarios de células diencefálicas los GC provocaron un aumento en los niveles del RNAm del péptido (Luo 1995, Pérez-Martínez 1998).

Otros estímulos como el frío y la succión en donde la liberación de TRH se incrementa, está acompañada de un aumento en los niveles de RNAm. Los incrementos son rápidos y transitorios (Zoeller 1995, Uribe 1993).

La respuesta de las células blanco del TRH en la hipófisis podría también modularse dependiendo de la tasa de degradación del tripéptido en sitios

específicos. Este mecanismo podría controlar la intensidad del estímulo o la duración de la acción del factor de liberación.

### 1.3.1. Inactivación del TRH

El TRH es sustrato tanto de enzimas solubles como membranales. En fracciones celulares solubles las enzimas piroglutamil peptidasa I (PPI; EC 3.4.21.26) y la prolil endopeptidasa (PE, EC 3.4.19.3) pueden degradar al péptido (O'Leary 1995). Sin embargo, puesto que el TRH viaja dentro de vesículas, estas enzimas no tienen acceso a él y no controlan los niveles de TRH liberados hacia el espacio extracelular (Charli 1987, Méndez 1990). Su relevancia como mecanismos de inactivación intracelular del TRH permanece en discusión (Faivre-Bauman 1986, Charli 1987, Méndez 1990). Estas dos enzimas tienen una especificidad amplia, y están distribuidas en diferentes tejidos. Pueden hidrolizar los enlaces pGlu-His y el His-Pro-NH<sub>2</sub> del TRH respectivamente (O'Cuinn 1990). La PE también se ha encontrado en membranas sinaptosomales en bovinos. No existe evidencia de que alguna de estas dos enzimas estén presentes en el cerebro como una ecto forma o que estén solubles en el espacio extracelular. Además, la inhibición de estas enzimas *in vivo* o *in vitro* con piroglutamil diazometil cetona y N-benzyloxycarbonil prolil prolinal no elevan la concentración de TRH en el cerebro (Charli 1987, Méndez 1990).

La enzima que puede inactivar al péptido en el espacio extracelular para terminar la transmisión de su mensaje es la piroglutamil peptidasa II (PPII) (EC 3.4.19.). Esta, ha sido purificada de membranas sinaptosomales (O'Connor 1984, Torres 1985), de cerebro de rata, y también se encuentra en las membranas de las células de la adenohipófisis (Vargas 1987).

De entre las tres enzimas que se conoce que podrían inactivar al péptido TRH, la PPII tiene mayor especificidad por su sustrato (Km de 40  $\mu$ M) e hidroliza el enlace piroglutamil-histidil del TRH pGlu-His-ProNH<sub>2</sub> y de péptidos sintéticos con secuencia pGlu-His-Trp o pGlu-His-Ala, así como pGlu-His-Pro. Péptidos naturales de estructura pGlu-X (X=péptido superior a tres aminoácidos), como el GnRH, (Hormona liberadora de las gonadotropinas), no son degradados por la PPII (O'Connor 1984, Garat 1985). La mayoría de las modificaciones del pGlu o de la His evitan la hidrólisis (Wilck 1989, Elmore 1990). La inhibición específica de la PPII con N-1-carboxil-2-feniletil (Nim benzyl)-histidil-beta-NA eleva la recuperación del TRH liberado de rebanadas de cerebro (Charli 1989). También se han obtenido datos similares inhibiendo a la enzima con LHRH (Ki de 20  $\mu$ M) (Charli 1989b). **Estos resultados apoyan a la PPII con un papel relevante en la degradación del TRH en el espacio**

**extracelular y se le ha propuesto como el mecanismo responsable de la inactivación del péptido liberado.**

La PPII es un homodímero de un peso molecular de 230 000 daltones (*Bauer 1994*). Se ha purificado de cerebro de cobayos, conejo (*Wilk 1989*), rata y porcino (*Bauer 1994*). El cDNA de la enzima cerebral y adenohipófisis de rata ya se ha clonado (*Schauder 1994*). Se ha descrito un sólo gen pero por lo menos se han detectado tres especies de mRNA (6-9.5 Kb) por Northern blots utilizando diferentes sondas. No se conoce aún la estructura del gen. La secuencia deducida corresponde a una proteína de membrana integral tipo II que contiene 1025 aa. Se le ha propuesto la siguiente topografía: una pequeña región intracelular N-terminal que contiene un sitio potencial de fosforilación por la proteína cinasa C (PKC); un dominio transmembranal de 22 aminoácidos de longitud, que ha sido predicho por un análisis de hidropatía; y una gran región extracelular con una secuencia consenso His-Glu-X-X-His y un segundo Glu separado por 18 aa, lo que es característico de peptidasas de zinc. El dominio extracelular también contiene una Tyr que es secuencia consenso de sulfatación y 12 sitios de glicosilación (*Schauder 1994*). La actividad de la enzima es preferencialmente inhibida por quelantes de metales (*O'Connor 1984, Garat 1985, Friedman 1986*). Los análisis de la enzima purificada señalan a los aminoácidos Glu, Tyr, His, Arg como necesarios para la actividad enzimática así como la presencia de un átomo de zinc fuertemente unido (*O'Connor 1987, Czekay 1993*).

La predicción topológica deducida del cDNA concuerda con estudios bioquímicos previos que muestran que la PPII está localizada en la membrana plasmática del compartimento sinaptosomal (*O'Connor 1984, Torres 1986*).

En cultivo de células de cerebro, en sinaptosomas o en células adenohipofisiarias se comporta como una ectoenzima, es decir, con el sitio activo hacia el espacio extracelular (*Charli 1988, Bauer 1990*). Tiene un pH óptimo neutro (*O'Connor 1985, Wilk 1989*) y, se encuentra principalmente en neuronas (*Cruz 1991*).

La enzima presente en la adenohipófisis (*Vargas 1987*), se encuentra preferencialmente en los lactotrofos (*Bauer 1990*). En este tejido su expresión coincide con la maduración de la regulación hipotalámica de los lactotrofos y la retroalimentación de las hormonas tiroideas (*Vargas 1992b*).

### I.3.1.1 Regulación de la enzima PPII en la adenohipófisis.

La actividad de la PPII de la adenohipófisis es modulable. El ciclo estral cambia la actividad de la enzima, pero las fluctuaciones no correlacionan con los cambios de E2, lo que indica una respuesta a influencias adicionales (Uribe 1991) ya que tampoco hay correlación con la liberación de TRH en estos experimentos.

En estudios *in vitro* en células adenohipofisiarias en cultivo se ha observado que los factores hipotalámicos que regulan la secreción de prolactina, ya sea positiva (TRH) o negativamente [dopamina (DA), somatostatina (SRIF)] también modulan la actividad de la PPII. El TRH ( $10^{-6}$  M) decrece la actividad de la PPII en un  $37 \pm 2\%$  a través de la activación de su receptor; su inhibición aparece lentamente y es máxima alrededor de 16 h de incubación (Vargas 1998). El péptido activador de la adenilciclasa ( $10^{-6}$  M) (PACAP) decreció la actividad de la enzima en un  $32 \pm 4\%$  mientras que el péptido intestinal vasoactivo (VIP) no tuvo efecto (Vargas 1998). La bromocriptina (un agonista del receptor D2 de DA) y la SRIF inhiben totalmente la regulación negativa inducida por TRH (Vargas 1994). Estos datos muestran que los mensajeros extracelulares que controlan la secreción de la prolactina también ejercen un efecto regulatorio a largo plazo en la actividad de la PPII. Estos efectos son probablemente debidos a la modificación de la biosíntesis ya que los niveles del mRNA de la PPII son regulados en forma similar a su actividad. El TRH provoca que los niveles de RNAm de la PPII disminuyan de 35 a 18 fg/ $\mu$ g de RNA total a las 16 horas después de exponer a células GH3 a TRH, pero presentándose un efecto significativo desde las 2 horas, a una dosis máxima de inhibición de  $10^{-7}$  M. (Lin 1998).

La inhibición de la actividad de la PPII ha sido inducida por la activación de la proteína cinasa C (PKC). El  $\beta$ -forbol-12 miristato-13 acetato (PMA) y el forbol 12,13 dibutirato decrecen los niveles de RNAm de la PPII en células GH3. Asimismo, el inhibidor de la PKC, el H7, es capaz de bloquear los efectos de TRH y de PMA sobre los niveles de RNAm de la PPII. El aumento de los niveles intracelulares de AMPc, o la activación de los canales de calcio tipo L provocan una regulación negativa de la actividad de la PPII. Esto sugiere que los efectos del TRH están mediados por la activación de los canales de calcio tipo L (Vargas 1994).

Las hormonas tiroideas controlan positivamente la actividad de la tiroiberinasa en el suero de rata, pero el tiempo de respuesta es relativamente lento y su sensibilidad es débil, en contraste con la respuesta de PPII cuya actividad está controlada muy estrechamente por el estado tiroideo y responde más rápido y con mayor sensibilidad a triyodotironina (Bauer 1987, Ponce 1988). El

hipotiroidismo provoca un incremento *in vivo* en los niveles del receptor hipofisiario de TRH, y una disminución de la actividad de la PPII, que contribuiría a aumentar la eficiencia del TRH. *In vivo*, el estradiol decrece la actividad de la PPII y antagoniza los efectos de las hormonas tiroideas (HT) (Bauer 1988, Schomburg 1997). Los estudios *in vitro* demuestran que las HT tienen una acción directa en la adenohipófisis (Bauer 1990). Los efectos hormonales pudieran ser debidos a una modificación en la síntesis ya que son precedidos por cambios similares en los niveles de su mRNA (Schomburg 1995, 1997).

#### **I.4. Regulación del metabolismo de TRH en el SNC.**

##### **I.4.1. Localización del pro-TRH**

###### Inmunocitoquímica

La identificación de la anatomía de los sistemas neuronales del TRH en el cerebro se ha facilitado por la caracterización de la estructura de la prohormona del TRH (Lechan 1992). La extensiva distribución del proTRH así como del TRH, (identificado por radioinmunoensayo) ayuda a explicar las acciones tan amplias de este péptido en los sistemas autonómicos, motor, sensorial y límbico.

Con inmunocitoquímica se ha identificado la ubicación de la prohormona en el soma neuronal, mientras que el péptido activo se encuentra concentrado en la terminal sináptica, de modo que al estudiar la distribución celular y regional de la prohormona, de los péptidos crípticos y del TRH, se han caracterizado zonas donde existe el RNAm pero no péptido activo y viceversa.

Así, se ha identificado que además del sistema tuberinfundibular, los péptidos inmunorreactivos diferentes al TRH se encuentran en otras regiones del hipotálamo y en zonas extrahipotalámicas. La mayoría de estas regiones también contienen TRH. Los péptidos crípticos se encuentran en neuronas del raphe y axones que descienden hacia la médula espinal para innervar las alfa motoneuronas del asta ventral y neuronas simpáticas pregangliónicas en la columna intermediolateral (Lechan 1989).

Varias regiones del cerebro se identificaron inmunopositivas para péptidos derivados del pro-TRH si bien no han sido positivas para el TRH; entre éstas se encuentran el septum medio, el núcleo basal de la estria terminal y el tallo cerebral. La escasa presencia de péptidos crípticos como el pAC12 en estas regiones, en contraste con su abundancia en el NPV y el raphe, ha llevado a pensar que el pro-TRH puede ser procesado de diferentes maneras en el cerebro,

dependiendo regionalmente del tipo de enzimas que contengan las neuronas (Lechan 1989, Bulant 1990).

#### Hibridización *in situ*.

La confirmación de los sitios anatómicos de la expresión del gen del pro-TRH en el SNC se ha realizado por estudios con hibridización "in situ" (Segerson 1987a). Muchos de estos sitios son los mismos donde se ha identificado la presencia de TRH por radioinmunoensayo (RIA). Otras regiones muestran la presencia del péptido pero no de su RNAm, por lo que los cuerpos celulares que lo sintetizan pueden provenir de otras zonas. Para estos estudios se utilizó una sonda de cRNA marcada con <sup>32</sup>P complementaria al cDNA del pro-TRH de rata flanqueado por el sitio de restricción de las enzimas EcoR1-PstI, que contiene la secuencia completa que codifica para el proTRH, así como para las porciones de su región 3' y 5' no traducidas. Se observó que el NPV contiene un gran número de células positivas distribuidas en una configuración triangular en los límites dorsales del tercer ventrículo. En cambio, en la parte anterior parvocelular, se identificaron pocos granos de plata.

Asimismo, se encuentra en regiones extrahipotalámicas como los núcleos del raphe, en los bulbos olfatorios, en la banda diagonal de Broca, extendiéndose a la región del septum medio y el núcleo septohipotalámico y en el núcleo basal de la estria terminal. Además, en numerosas neuronas del núcleo reticular del tálamo, y en la región ventrolateral de la zona del periacueducto. Una importante colección de pequeñas neuronas es positiva en el núcleo basal de la comisura anterior. Dentro del estriado, el producto inmunorreactivo está presente en neuronas bipolares y multipolares difundidas a través del caudado-putamen y tienden a ocupar una porción más lateral del núcleo al nivel del quiasma óptico. El núcleo central de la amígdala es positivo, en cambio no existe hibridización en el hipocampo, en la corteza cerebral (Lechan 1992), en el cerebelo ni en el puente (Lechan 1987). Los núcleos motores del vago también expresan el RNAm de proTRH y TRH. Estas regiones contienen una sola banda de RNAm que hibridiza con la sonda por Northern blot, lo que corresponde al RNAm del pro-TRH de 1.6Kb extraído del NPV, indicando la especificidad de las observaciones.

La distribución anatómica del TRH extrahipotalámico también abarca núcleos motores del tallo cerebral, incluyendo los núcleos hipoglosos, donde se han encontrado (por técnicas de inmunohistoquímica) terminales nerviosas que contienen TRH así como receptores a TRH (Sharif 1983). Se han identificado áreas, que si bien, muestran la presencia de TRH por RIA, no así del RNAm del proTRH. Algunas son el núcleo accumbens del telencéfalo y el giro dentado del hipocampo así como, la corteza cerebral (Lechan 1992).

**Tabla 2. Distribución del proTRH en el SNC.**

<b>Diencéfalo</b>	<b>Perikarya</b>	<b>Fibras</b>
Hipotálamo anterior	+	+
Eminencia media		+
Núcleo Paraventricular del Hipotálamo	+	+
Area Preóptica	+	+
<b>Telencéfalo</b>		
Bulbo Olfatorio	+	+
Estría terminal	+	+
Caudado-putamen	+	+
Amígdala (núcleos medial y central)	+	+
Hipocampo (capas piramidales CA2/CA3)	+	
Núcleo Accumbens		+
Corteza piriforme	+	
<b>Mesencéfalo y metencéfalo</b>		
<i>Locus coeruleus</i>		+
Sustancia nigra, <i>pars lateralis</i>	+	
<b>Mielencéfalo</b>		
Núcleos hipoglosos		+
Núcleos del raphe	+	+

Lechan RM, Toni R. *Neuroendocrinology*, 1992.

#### **1.4.2. Efectos celulares del TRH en el Sistema Nervioso Central.**

La caracterización de la proteína precursora del TRH ha permitido analizar su distribución en el cerebro, así como identificar los péptidos crípticos que se originan durante el procesamiento de la prohormona y los que tienen actividad biológica independiente (Lechan 1992).

El efecto del TRH en el Sistema Nervioso Central (SNC) ha sido relacionado con la actividad de receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido y amino butírico (GABA) y, con la síntesis y liberación de catecolaminas y acetilcolina. Los resultados son controvertidos dependiendo de la región donde se inyecte el tri péptido y del tipo de neurotransmisor presente en la zona.



Como activador de la transmisión sináptica:

El TRH tiene potentes acciones sobre el sistema motor a diferentes niveles anatómicos. La inyección de TRH (*Miyamoto 1977*) o su análogo TA-0910 (*Yamamura 1991*) en el n. accumbens induce actividad locomotora acelerada, conducta de masticación y olfateo. La administración intratecal de TRH induce "wet-dog-shakes" y castañeteo de las mandíbulas, probablemente por una acción a nivel de la médula espinal o tallo cerebral. La inyección del TRH en el cuarto ventrículo incrementa la tasa respiratoria, sugiriendo una acción sobre los centros respiratorios (*Rekling 1992*).

A nivel de la médula espinal el TRH incrementa la excitabilidad de las motoneuronas espinales y los potenciales de campo antidrómicos, las despolarizaciones de la raíz ventral, así como el reflejo monosináptico. Esto ha sido explicado por un efecto directo del TRH en las motoneuronas espinales y una facilitación de la liberación de neurotransmisores excitadores (*Rekling 1992*).

Mediante registros intracelulares se detectó que el TRH (50 $\mu$ M) potencia la acción excitadora del NMDA y no de Glu o Asp o Ac. quisquálico (activador de los receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole-4-propiónico [AMPA]) en las motoneuronas espinales a través de su acción sobre las propiedades electroresponsivas de la membrana neuronal. La potenciación del TRH sobre la acción despolarizante de los receptores a NMDA es dependiente del voltaje, siendo significativamente mayor a -66mV y a -70mV (medido como el área bajo la curva); a -74mV el efecto es mucho menor. La amplitud muestra un incremento a -70mV de 133% vs 58% a -74mV y la resistencia se incrementa un 93% a -70mV vs un 50% de aumento a -74mV (*Rekling 1992*). La despolarización inducida por el TRH en los núcleos hipoglosos incrementa la resistencia de las motoneuronas espinales, lo cual es un factor necesario para la activación sináptica y para la aparición de convulsiones (*Rekling 1990*).

El TRH incrementa la tasa de disparo y la frecuencia y amplitud de los potenciales postsinápticos excitatorios en cultivos de células de médula espinal, en núcleos motores dorsales del vago y en células GH3 hipofisarias. Su efecto está relacionado con la activación de la conductancia de los canales de K<sup>+</sup> (*Nistri 1990*). El sitio de acción (pre- o post sináptico) permanece bajo estudio (*Travagli 1992*).

El TRH interactúa con otros sistemas de neurotransmisores. Registros extracelulares en neuronas neo-corticales, muestran que el TRH potencia la acción excitadora de la acetilcolina (*Kasparov 1994*) pero inhibe la excitación del glutamato (*Renaud 1979*). *Winokur y Beckman 1978*, no encontraron efecto del TRH sobre la actividad evocada por el L-glutamato en neuronas neocorticales

mientras que *Braitman 1980*, describió acciones excitadoras e inhibitoras (*Kasparov 1994*). En registros intracelulares de estas células, el TRH ( $5\mu\text{M}$ - $50\mu\text{M}$ ) no cambia el potencial de membrana de reposo. TRH  $50\mu\text{M}$  aumenta la resistencia a la corriente de entrada ( $R_n$ ), el número de espigas, la duración de los EPSP y, la dependencia de voltaje en una manera dosis dependiente. El efecto es antagonizado por ácido D-2-amino-5-fosfonopentanoico (D-APV) (antagonista de receptores a NMDA) y es explicado por la modulación de la corriente de sodio dependiente del tiempo y sensible a tetrodotoxina (TTX) (*Kasparov 1994*).

En neuronas hipotalámicas, el TRH modula la respuesta a glutamato pero no a acetilcolina (*Stocca 1995*).

En neuronas CA1 hipocampales el TRH ( $10\mu\text{M}$ ) potencia fuertemente la respuesta a NMDA a un potencial de membrana de reposo ( $-67 \pm 2\text{mV}$ ). Utilizándose bloqueadores de los potenciales sinápticos mediados por los receptores a AMPA/kainato,  $\text{GABA}_A$  o  $\text{GABA}_B$  (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona CNQX;  $10\mu\text{M}$ , bicuculina  $20\mu\text{M}$ , y ácido p-3-aminopropil-p-di-etoximetil fosfínico CGP35348  $1\text{mM}$ ), se ha podido aislar la acción del TRH sobre los receptores a NMDA concluyendo que el efecto es específico sobre este tipo de receptores. Los potenciales postsinápticos excitatorios (EPSP) en estas condiciones crecen en amplitud y alcanzan un umbral de disparo a los 80 seg sin cambio detectable en el potencial de reposo. El efecto del TRH es transitorio (6-7 min) y a nivel postsináptico. No induce la liberación de Glu, lo que queda demostrado porque no hay un cambio en los EPSP de los receptores AMPA/kainato. Además, la liberación de Glu de la presinapsis sería suficiente para saturar los receptores a NMDA e impediría observar un efecto del TRH sobre la liberación de Glu (*Stocca 1994*).

*Kasparov 1994* y *Stocca 1995* no encuentran probable que la acción potenciadora del TRH resulte de un aumento en la resistencia de la membrana postsináptica o de una despolarización de la membrana, suficiente para atenuar el bloqueo del  $\text{Mg}^{+2}$  de los canales de NMDA, o bien de producir un cambio en la conductancia de los iones de  $\text{K}^+$ ; más bien proponen que el mecanismo para el efecto del TRH sobre las células piramidales CA1 del hipocampo sea a través de sus receptores (*Sharif 1989*), afectando alguna vía de transducción intracelular.

Aunque en otras regiones cerebrales el TRH induce el aumento de AMPc y fosfatidilinositol, éstos no están elevados por el tripéptido en células neocorticales, hipocampo ni pons-médula. Sin embargo, otros segundos mensajeros podrían estar modificados. Estos cambios pueden provocar la fosforilación de los receptores a NMDA y una consecuente amplificación de las respuestas sinápticas. Los efectos transitorios del TRH se pueden explicar por el

consumo de los metabolitos intracelulares y por la taquifilaxis del receptor de TRH (Stocca 1995).

Las funciones biológicas en que se ha implicado al tripéptido aparecen en la **Tabla 3**

**Tabla 3. Efectos del TRH en el Sistema Nervioso Central.**

- a. Tiene un efecto termorregulador: induce hipo e hipertermia dependiendo de la especie (rata y conejo respectivamente).
- b. Induce actividad locomotora.
- c. Mejora el tono muscular (antagoniza la relajación inducida).
- d. Tiene efectos cardiovasculares: incrementa la presión sanguínea y el ritmo cardíaco.
- e. Incrementa la tasa respiratoria.
- f. Incrementa o decrece la motilidad gástrica dependiendo de la especie, incrementa la secreción de ácidos y el vaciamiento gástrico.
- g. Disminuye el consumo de agua y alimentos.
- h. Revierte la sedación natural provocada por la hibernación
- i. Revierte el efecto narcótico del etanol.

O'leary and O'Connor 1995

#### **I.4.3. Inactivación del TRH en el SNC.**

La actividad de la PPII está enriquecida en el Sistema Nervioso Central, donde se encuentra amplia y heterogéneamente distribuida. La mayor actividad específica se encuentra en la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el hipocampo y el cerebelo; los niveles más bajos se han encontrado en la médula espinal (Vargas 1987, 1992). Aunque no existe una correlación significativa entre la distribución cerebral de la actividad de la PPII y la unión de TRH a sus receptores, las regiones que tienen una alta unión, también contienen altos niveles de actividad de la PPII (Vargas 1987, 1992).

Estudios *in vitro* donde se utilizan cultivos primarios de neuronas o glía, o líneas celulares gliales o neuronales muestran, que en el cerebro, la PPII está principalmente en neuronas (Cruz 1991). Su desarrollo está asociado con diferentes sistemas TRHérgicos en el cerebro (Vargas 1992). La degeneración de las neuronas de TRH en la médula espinal de rata, donde el péptido coexiste con serotonina, disminuye los niveles de TRH pero no la actividad de la enzima, lo que sugiere que la localización de ésta es postsináptica (Joseph 1994).

La distribución del mRNA de la PPII en el cerebro y otros órganos analizada por el ensayo de protección de RNAsa, es muy similar a la de su actividad enzimática. El nivel más alto de mRNA de la PPII se ha encontrado en cerebro ( $705 \pm 47$  fg/ $\mu$ g de RNA total). En pulmón se encontraron niveles significativos ( $116 \pm 13$  fg/ $\mu$ g) y en la hipófisis ( $42 \pm 2$  fg/ $\mu$ g). La distribución del mRNA de la PPII en el cerebro es heterogénea. La mayor cantidad se encontró en la corteza posterior ( $1,056 \pm 83$  fg/ $\mu$ g) seguida del hipocampo, el cerebelo, la corteza frontal, el bulbo olfatorio, la amígdala, el estriado, el tálamo, el hipotálamo y el nivel más bajo en el tallo cerebral ( $129 \pm 19$  fg/ $\mu$ g). Las actividades enzimáticas en las regiones cerebrales concuerdan y se correlacionan con los niveles de mRNA a excepción del cerebelo, donde la actividad de la enzima es relativamente baja, mientras que el nivel de mRNA es relativamente alto. Omitiendo al cerebelo, la actividad de la enzima y sus niveles de mRNA correlacionan con una  $r=0.892$  (Lin 1998), lo que sugiere que la enzima es activa cerca de su sitio de síntesis. La distribución del RNAm de la PPII en el cerebro no correlaciona con los niveles del péptido de TRH en las diferentes regiones estudiadas, ya que la concentración más alta del péptido se encuentra en el hipotálamo. En cambio, los niveles más altos del RNAm de la PPII y de su actividad se encuentran en las áreas corticales y no coinciden con los niveles del péptido en cuanto a su inmunorreactividad y a la densidad de sus receptores, por lo que se podría considerar la posibilidad de que la especificidad de la PPII por su sustrato sea más amplia de lo que se reconoce (Lin 1998).

En muchas áreas, los patrones de hibridización *in situ* del mRNA del receptor de TRH y de la PPII son similares, lo que también apunta a una localización postsináptica, y en otras no se encuentra esta codistribución (Uribe 1996, Heuer 1998). La densidad más alta de la unión de los receptores a TRH se ha identificado en la región de la amígdala, y la más baja en el cerebelo (Lin 1998). Estas discrepancias pueden ser debidas a diferencias en sensibilidad del método utilizado, o bien a la necesidad de inducir el receptor o la enzima en estas zonas, o a la existencia de un mecanismo alternativo de inactivación. La reciente identificación de un nuevo receptor de TRH (Itadani 1998, Cao 1998) abre la posibilidad de que la PPII está colocalizada con éste.

La acción de la PPII sobre el TRH produce His-Pro-NH<sub>2</sub>, un dipéptido que se puede degradar a His-Pro por la enzima dipeptidilaminopeptidasa IV (EC 3.4.15.1), que es una ectoenzima presente en el cerebro y otros órganos, o bien se puede ciclizar hacia una molécula más estable, la His-Pro-diketopiperacina (HPD). Esta última tiene una alta concentración en el cerebro y posee múltiples actividades biológicas. Sin embargo, no se han identificado receptores de alta afinidad por la HPD, lo que pone en duda su relevancia (Charli 1998). De cualquier modo, se ha propuesto a la PPII como el mecanismo que produce por lo menos una parte del HPD, por lo que el papel de

la PPII puede no sólo ser el de inactivar TRH sino, en diferentes situaciones o *loci* específicos, el de biotransformarlo en un péptido con otra actividad biológica.

### 1.5. TRH como neuromodulador.

La participación del TRH como neuromodulador se ha apoyado por estudios farmacológicos en donde la inyección i.v. o i.c.v. induce cambios conductuales en los animales y en humanos. Por ejemplo provoca un menor consumo de agua y alimento (*Vijayan 1977*), induce la activación del sistema locomotor (*Yamamura 1991*), reduce la intensidad de las convulsiones del tipo espasmos infantiles (*Matsumoto 1987*) y potencia la acción anticonvulsivante del fenobarbital sobre las crisis generalizadas producidas por choques electroconvulsivos (*Nemeroff 1975*). Además, revierte efectos narcóticos e hipotérmicos de la inyección i.p. de etanol o bien de animales sometidos al frío (*Zoeller 1992*).

Estudios en paralelo con modelos animales que ejemplifican condiciones estresantes como son el ayuno (*de Gortari 1999 sometido, Nikodemova 1998*), la inmovilización (*Sattin 1999*) o los choques electroconvulsivos y el kindling amigdalino (modelos de depresión y epilepsia, respectivamente) han permitido involucrar al péptido con conductas y alteraciones del SNC e identificar sitios de acción endógena (evaluando los cambios en el contenido de TRH específicamente, en regiones cerebrales relacionadas con la patología o función en estudio). El ayuno en animales adultos provoca cambios en el contenido de TRH en la amígdala (*de Gortari 1999 som.*) que está relacionada con la selección de nutrimentos y funciones sensoriales, y en la región septohipocampal (*Nikodemova 1998*) involucrada en aprendizaje y memoria. En animales recién destetados la alteración aparece también en hipocampo y en n. accumbens induciendo la hiperactividad en los animales (*de Gortari 1999 som.*).

Esencialmente en todos estos modelos se ha analizado el contenido de TRH por RIA y sus niveles de RNAm.

Otro evento de relevancia en el metabolismo del TRH es su degradación por la enzima PPII. Su regulación no se ha demostrado en el cerebro, en contraste con lo observado en células hipofisiarias. En cultivos primarios de neuronas hipotalámicas o corticales, la actividad de la PPII no se modula por TRH, cAMP o ésteres de forbol. Ni el estradiol, ni las hormonas tiroideas influyen en la actividad de la PPII de hipotálamo (*Bauer 1988*). Los estudios *in vivo* (en los que se inyecta una sola dosis de T3 en los animales) muestran un incremento en los niveles de RNAm de la PPII en la adenohipófisis, pero no en la corteza frontal ni en el

cerebro total (Ponce 1988). En otros tejidos sólo se encuentra un incremento significativo en el hígado. Tampoco la inyección intravenosa de TRH tiene efecto en los niveles de RNAm de PPII cerebral, sólo una ligera disminución en la adenohipófisis (Lin 1998).

Sin embargo, existen evidencias que sugieren una posible regulación de la actividad de la enzima en el SNC. Una de ellas es el desarrollo de la actividad de la PPII en el cerebro correlacionada con el proceso de diferenciación celular (aparición de sinapsis) (Vargas 1992b). Otra, la evidencia de que al degenerar la vía presináptica, la actividad de la PPII aumenta a tiempos largos en la zona lumbar de la médula, de la misma manera que los receptores (Joseph 1994), lo que sugiere una regulación similar de las dos proteínas.

Se decidió entonces probar dos modelos que activan la transmisión TRHérgica en regiones extrahipotalámicas, **el kindling amigdalino y la inyección intraperitoneal de etanol** (3g/Kg de peso corporal en ratas), para determinar si provocando la liberación del TRH sináptico, se modifica la actividad de la PPII en el SNC.

En el **kindling amigdalino** se tienen datos más amplios del metabolismo del péptido; como cambios en la unión a sus receptores en regiones epileptogénicas y su liberación (*in vitro*) (Kubek 1993). Con este paradigma, medimos (de Gortari 1995) la concentración de TRH en las etapas II, IV, y V en regiones epileptogénicas, como el núcleo accumbens, hipotálamo, núcleos del raphe, bulbos olfatorios y además, la actividad de la enzima PPII.

En la región del núcleo accumbens y en el hipotálamo se observó un decremento significativo de TRH en el estadio II a partir del cual los niveles se fueron recuperando hasta alcanzar valores similares a los de los animales sham en el estadio V; en la corteza frontal, la amígdala y el hipocampo se encontró un aumento desde el estadio II que fue incrementándose hasta observar valores de hasta un 200% en el estadio V al comparar contra los valores de los animales control (sham). El decremento observado en el contenido de TRH en algunas de las estructuras estudiadas, sugiere que durante las primeras estimulaciones eléctricas se produce un aumento dramático en la liberación de TRH. Esto es más evidente al comparar la respuesta de la región contralateral vs la ipsilateral al sitio de la estimulación.

Asimismo, encontramos que la actividad de la enzima PPII está elevada durante las primeras etapas del kindling (estadio II) e inhibida en un 30% en el establecimiento del estadio V, específicamente en áreas epileptogénicas, como la amígdala, la corteza frontal y, el hipocampo (de Gortari 1995).

Además, correlacionamos los parámetros electroencefalográficos del progreso del kindling (duración y frecuencia de las postdescargas) con la tasa de cambio en la concentración de TRH en las diferentes regiones estudiadas (de Gortari 1998), demostrando que las correlaciones son diferenciales dependiendo de la zona y reforzando la participación del péptido en la epileptogénesis.

El modelo permitió identificar las regiones cerebrales que responden a la estimulación eléctrica con cambios en el contenido de TRH y en la actividad de la enzima, definir la participación del TRH en la epileptogénesis, la regulación de la actividad de la PPII y, su relevancia para la función del péptido.

*El objetivo de este trabajo es definir el nivel de regulación de la enzima (cambios en su transcripción) e identificar las células que responden al estímulo eléctrico.*

*Se contrastaron los resultados con otro modelo de activación de la vía TRHérgica: la inyección i.p. de etanol.*

*El etanol y el TRH actúan a través de vías interrelacionadas. El TRH bloquea los efectos narcóticos del etanol, y los dos están involucrados en el mantenimiento de la termogénesis. Con este modelo comenzamos por definir los cambios endógenos en el contenido de TRH en regiones involucradas en la actividad locomotora (n. accumbens), en funciones cognoscitivas (corteza frontal), en aprendizaje y memoria (hipocampo) y en regiones donde el TRH tiene una participación como hormona (hipotálamo). También medimos los cambios en la actividad de la enzima PPII. A partir de estos datos la estrategia fue la misma: identificar el nivel de regulación de la PPII (cuando existieron modificaciones) y describir la cinética del contenido de RNAm de TRH.*

***Los cambios en la actividad y en la síntesis de la enzima por el etanol implicarían que los procesos de transmisión peptidérgica no sólo se regulan por eventos que alteran la liberación del péptido, la eficiencia del receptor o la transducción de la señal intracelularmente, sino también del tiempo de permanencia del péptido en la sinapsis.***

**A continuación se describen antecedentes de ambos modelos.**

### **1.5.A. Inyección intraperitoneal de etanol como modelo de modificación de la transmisión TRHérgica.**

Comparado con las diferentes drogas de abuso el etanol tiene particularidades, es muy débil, su potencia requiere cantidades de gramos/Kg de peso, mientras

que la mayoría de los fármacos son potentes en el orden de miligramos o hasta microgramos/Kg de peso.

Los blancos moleculares específicos del etanol aún no han sido identificados, a pesar de que se han invertido más de 25 años en investigar sus mecanismos de acción. No parece unirse específicamente a receptores neuronales como la mayoría de las drogas de abuso, pero sí modula selectivamente las reacciones de unión en sistemas de neurotransmisores específicos. Además, el etanol afecta aparentemente a todas las regiones del cerebro, pero no se ha distinguido si altera sólo neuronas o también glía (Crabbe 1997).

Para identificar los circuitos afectados específicamente por el etanol, se han utilizado técnicas como la inyección de 2-[<sup>14</sup>C] desoxiglucosa (2-DG) pocos minutos después de una administración aguda de etanol en ratas. Con esta técnica se observó que los efectos del etanol son dependientes de la dosis en la utilización de glucosa cerebral local. Las dosis bajas tienden a estimular la actividad cerebral en circuitos mesocorticolímbicos y dopaminérgicos nigrostriatales, mientras que las altas dosis deprimen la actividad en muchas áreas del cerebro, incluyendo las áreas límbicas, motoras y sensoriales. La actividad del hipocampo sigue un patrón bifásico (Crabbe 1997).

La administración aguda de etanol induce la expresión de *c-fos* en áreas como los núcleos centrales de la amígdala, el núcleo accumbens, el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, los núcleos del tracto solitario y las áreas neocorticales. Además, una sola inyección de etanol induce la expresión de *c-fos* en el NPV pero decrece la expresión de *c-jun* en el NPV y en el hipocampo (Zoeller 1994).

Hace un siglo Meyer (1899) y Overton (1901) demostraron que la potencia anestésica de los alcoholes se correlaciona con su coeficiente de partición entre el aceite de oliva y el agua. Este descubrimiento llevó a la teoría de que el etanol y sus acciones anestésicas se relacionan con su partición en las membranas y a la alteración de la fluidez de las mismas. A pesar de estudios extensivos de los efectos del etanol en la estructura lipídica, no se han podido explicar las acciones farmacológicas y conductuales del etanol, particularmente la euforia y los efectos intoxicantes que ocurren a dosis más bajas que las que causan anestesia.

En los últimos años se ha identificado que el principal sitio de acción del etanol son los canales iónicos. La sensibilidad de los canales iónicos al etanol u otros anestésicos correlaciona con la hidrofobicidad que tiene la droga en estudio. Los canales iónicos son estructuras multiméricas, con diferentes subunidades, que facilitan el tráfico de iones dependiendo de los cambios que sufre su estructura terciaria. Pequeños cambios en la conformación de alguna o algunas de las subunidades producen transitoriamente una forma abierta del canal. Estas



transiciones pueden requerir el movimiento de conjuntos de aminoácidos de una posición oculta en la estructura molecular multimérica a una posición en el espacio extracelular, o hacia la cercanía de dominios intramoleculares que regulan las propiedades de apertura de los canales iónicos (Crabbe 1997).

El etanol es menos polar que el agua y puede reemplazarla en la estructura molecular de proteínas, pero no puede formar tantos puentes de hidrógeno como ella; así, el etanol entra fácilmente a sitios moleculares de canales iónicos modificando las fuerzas y enlaces importantes para las propiedades cinéticas de apertura de estos. La diversidad en la composición de las subunidades de los canales iónicos da lugar al espectro tan amplio de sensibilidad al etanol que tienen las diferentes células; esto se traduce en diferencias regionales en el cerebro a la sensibilidad al etanol (Crews 1996).

El etanol afecta los canales iónicos activados por un receptor o por voltaje. Los dos canales estudiados con grandes detalles son el receptor a NMDA y el GABA<sub>A</sub> (Crews 1996). La administración aguda de etanol está relacionada con la inhibición de los subtipos de receptores a glutamato NMDA y la potenciación de ciertos subtipos de los canales iónicos de los receptores a GABA. Además, el etanol afecta la actividad de neuronas glicinérgicas, colinérgicas, serotoninérgicas y TRHérgicas. También altera los canales de K<sup>+</sup> y de Ca<sup>2+</sup> sensibles a voltaje (Crews 1996).

### 1 5. A. 1. Interacción entre el TRH y etanol.

Las dosis elevadas de etanol administradas en forma aguda provocan alteraciones en funciones biológicas donde participa el TRH. La inyección intraperitoneal de etanol induce hipotermia (3g/kg de peso) (Zoeller 1992) 1 y 3 horas después de su administración y reduce el incremento en los niveles de RNAm de TRH que resulta de someter a los animales al estímulo de frío (Zoeller 1992, Uribe 1995). Además, la inyección i.c.v. de TRH bloquea la hipotermia inducida por la inyección de etanol.

En animales mantenidos a temperatura ambiente, la inyección i.p. de etanol eleva los niveles del RNAm de TRH específicamente en el NPV del hipotálamo, después de reducir la concentración de T3 circulante. En estas condiciones, el etanol no tiene efecto sobre los niveles de RNAm de otras hormonas como la vasopresina del núcleo supraóptico ni de la somatostatina del NPV; tampoco afecta la expresión del proTRH en otras regiones como el núcleo reticular talámico (Zoeller 1992).

El etanol afecta el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides produciendo hipotiroidismo, al disminuir la conversión hepática de T4 en T3

(Cicero 1981); altera además, la respuesta de TSH en la adenohipófisis a TRH (Zoeller 1992).

El TRH y el etanol no sólo actúan a nivel del eje HHT. En el SNC el TRH acorta el tiempo de narcosis inducida por la administración aguda de etanol en ratas (Morsorati 1993, French 1993); altas dosis de etanol suprimen la actividad locomotora e inducen sedación, mientras que el TRH bloquea este efecto (Breese 1985), posiblemente por activación de las vías dopaminérgicas en regiones como el núcleo accumbens (Kretschmer 1996).

El TRH activa las vías colinérgicas y mejora la función cognoscitiva de los animales afectados por el suministro crónico del etanol (Itoh 1994, Ogasawara 1995, 1996). El uso de drogas anticolinérgicas previenen el efecto analéptico del TRH (French 1993, Kahn 1993).

La preferencia de consumir alcohol es bloqueada por la inyección de análogos de TRH. El efecto del TA-0910 en la ingestión de alcohol, es antagonizado sólo por inhibidores de los receptores de dopamina D2 (etilcopride), lo que lo postula como los mediadores del efecto supresivo del TRH en el consumo de alcohol (Mason 1997).

El TRH y el etanol interactúan con los receptores de NMDA alterando la neurotransmisión glutamatérgica en el hipocampo y en las neuronas corticales (Stocca 1995, Kasparov 1994), así como con los canales iónicos de los receptores a GABA (Barbieri 1997, Crews 1996).

La inyección intraperitoneal de etanol activa las vías TRHérgicas en regiones cerebrales involucradas en el aprendizaje, la memoria, la actividad locomotora, el despertar, durante y después de la sedación de los animales, lo cual apoya el efecto bloqueador del TRH sobre las acciones del etanol y por lo tanto, constituye un modelo en el que podrían observarse cambios en la actividad de la enzima y/o en su síntesis.

Los antecedentes sobre el efecto del etanol en la actividad de la enzima PPII son estudios con cultivo de células hipotalámicas. Las dosis bajas de etanol (5mM) disminuyen la actividad específica de la PPII a tiempos largos (24, 72 y 96hrs); y a dosis altas (50mM) no se encuentra un efecto significativo, lo que hace pensar que no se trata de un cambio en la conformación de la enzima membranal sino un efecto más específico a otro nivel (Fierros 1993).

La actividad de la enzima degradativa del TRH es modificable *in vitro* en adenohipófisis por diferentes efectores: PACAP, AMPcíclico, ésteres de forbol, y por el propio TRH. En condiciones fisiológicas como el hipotiroidismo e

hipertiroidismo, la regulación tanto de la actividad como de los niveles de RNAm en estudios *in vivo* e *in vitro* está ya identificada y caracterizada.

A estos mismos paradigmas, la actividad de la enzima en regiones cerebrales como la corteza frontal y el hipotálamo resultó refractaria.

En cambio, utilizando como modelo el kindling amigdalino se ha evidenciado la regulación de la actividad de la enzima en el Sistema Nervioso Central.

La regulación de la enzima indica que su actividad puede contribuir a la intensidad de la transmisión del mensaje de su sustrato, el TRH, y dada la participación del péptido en diversas funciones biológicas, en la epileptogénesis y en la narcosis inducida por el etanol, se manifiesta como relevante la identificación del nivel de regulación de la enzima así como las células que responden a los estímulos fisiológicos suministrados, porque se podrían caracterizar el tipo de receptores y en consecuencia las posibles moléculas responsables de este evento.

Esto daría lugar a la búsqueda de estrategias y diseño de inhibidores como agentes terapéuticos que controlando la acción de la enzima reduzcan la intensidad de las convulsiones en epilepsia por ejemplo.

## II A OBJETIVOS.

Definir si existen cambios en el contenido de TRH y en la actividad de la enzima PPII en el SNC con la inyección i.p. de etanol, así como el nivel de regulación de esta actividad.

### I 5. B. Kindling amigdalino como modelo de activación de la vía TRHérgica.

#### I 5. B1. Kindling amigdalino como modelo de epilepsia.

El kindling amigdalino es el proceso de administración intermitente y repetitiva de estímulos eléctricos subconvulsivantes en la amígdala, que eventualmente producirán la aparición de convulsiones generalizadas. Durante el proceso de estimulación, la actividad electrográfica, denominada postdescarga (PD) inicialmente está localizada en el área que rodea al electrodo pero eventualmente se propaga a otras áreas del cerebro no estimuladas, particularmente las regiones límbicas (Racine 1972). Las áreas del cerebro que son generadoras de PD son la

amígdala, la corteza piriforme, la corteza entorhinal y el hipocampo ventral (Racine 1986). En la amígdala de la rata, el umbral de la PD se encuentra en el rango de 40-100  $\mu$ A (Goddard 1967).

Las convulsiones provocadas por la estimulación eléctrica evolucionan también conductualmente. Con las primeras estimulaciones se presentan movimientos faciales clónicos y progresivamente aparecen movimientos de las extremidades anteriores y posteriores hasta que se presenta un levantamiento del animal y la caída subsecuente con convulsión generalizada (Racine 1972).

Aunque los cambios bioquímicos y moleculares del kindling amigdalino no son del todo claros, ocurre una secuela de modificaciones en el número de receptores y/o en su afinidad, cambios en la actividad de segundos mensajeros, en la expresión genética y en el crecimiento celular. Algunos de estos cambios son transitorios y otros son permanentes (Rosen 1992)

## I 5. B2. Cambios moleculares y celulares durante el kindling.

-*Alteraciones post-sinápticas.* Una de las características del fenómeno del kindling, es que las alteraciones que involucra a las células blanco, alejadas del sitio de la estimulación, que son transinápticamente transformadas, son post sinápticas. Estas células retienen propiedades de aquéllas directamente influenciadas por la estimulación eléctrica, aún después de eliminar las conexiones entre ellas. Estas observaciones indican que la alteración es post-sináptica e independiente de los eventos neurales por los cuáles se estableció (Kang 1996).

-El establecimiento del kindling es un evento a *largo plazo*.

-La estimulación eléctrica debe ser *intermitente* (para la amígdala 200 $\mu$ A, 62,5 pps, por dos segundos diariamente). La activación continua provoca la depleción de alguna molécula de concentración limitada, que es necesaria para el progreso del kindling (Kang 1996).

-Activación de la *síntesis de proteínas*. Los intervalos interestímulos pueden ser necesarios para permitir la síntesis de cantidades críticas de moléculas, (neurotransmisores clásicos, o péptidos) para producir cambios a nivel de las sinapsis. Esto ha sido corroborado con experimentos donde se inyectó cicloheximida, o anisomicina (bloqueadores de síntesis de proteínas) y se observó que la duración de las postdescargas (PD) de animales con 5 estimulaciones se mantenía, es decir no llegaba a progresar o establecerse el kindling. No es un efecto anticonvulsivante porque no deprime la duración de las PD, tal como lo

hacen las drogas como el fenobarbital, lo que comprueba que la activación de la síntesis de proteínas es necesaria para el progreso del kindling (Kang 1996).

-*Transporte axonal.* No sólo se requiere de la activación de la síntesis de proteínas, sino también del transporte axonal acelerado. Los experimentos de Morrel *et al* indican que no sólo se requiere de la transmisión eléctrica, sino de la transferencia de una molécula o moléculas desde el sitio primario a neuronas blanco para facilitar y mantener la transmisión sináptica (Morrel 1986).

-Los cambios EEG *duraderos* son resultado de los cambios químicos inducidos por el kindling. Pero también hay cambios transitorios.

### 15. B 3. Mecanismos bioquímicos involucrados:

Los diferentes sistemas de neurotransmisores no existen aislados, y trabajan en asociaciones interactivas. Es probable, por lo tanto, que la anomalía en un sistema durante el progreso y establecimiento del kindling esté acompañada de alteraciones en otro sistema relacionado (Burnham 1990).

*Norepinefrina.* Es una catecolamina clasificada como neurotransmisor del sistema nervioso central, que se encuentra en altas concentraciones en todas las regiones cerebrales en la rata. Los cuerpos celulares que dan lugar a los axones que liberan NE están localizados en tres núcleos de la pons-médula. El mayor de ellos es el *locus ceruleus*. Los efectos de la NE son inhibitorios, rápidos y transitorios cuando se aplica iontoforéticamente, o cuando se estimula el *locus ceruleus*. Su relevancia en el progreso del kindling resulta de los experimentos en los que las moléculas antagonistas y depletoras de la NE aceleran el kindling amigdalino. Ej: la neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA). En cambio, los fármacos que aceleran el sistema NE retardan el kindling amigdalino. Algunos cambios en las neuronas NE son duraderos después de dos semanas del establecimiento del kindling, como la actividad decrecida de la enzima tirosina hidroxilasa, y de la unión a los receptores  $\beta$ . Sin embargo otros cambios son transitorios, ej, los niveles de NE, sus metabolitos y su liberación no cambian.

Aunque es claro que la manipulación del sistema noradrenérgico afecta el desarrollo de las convulsiones del kindling, éste no causa deficiencias duraderas de NE en el cerebro, y el aumento farmacológico de la actividad de las neuronas NEérgicas no revierte el estadio del kindling a una etapa previa. Por lo que si bien el sistema NE tiene un importante papel en el desarrollo de las convulsiones, no es el sistema principalmente afectado ni involucrado en el progreso del kindling amigdalino (Burnham 1986).

GABA. Es el principal neurotransmisor inhibitorio en el cerebro de mamíferos. Las mayores concentraciones se encuentran en el *globus pallidus*, el *núcleo accumbens*, la *sustancia nigra* y el *núcleo dentado cerebelar*. La inhibición de la respuesta neuronal por la aplicación de GABA, se debe a la apertura de los canales iónicos de  $Cl^-$ . La respuesta está mediada por un receptor específico que en realidad es un complejo macromolecular que consiste de 1) el receptor de GABA, 2) el receptor de las benzodiazepinas y, 3) el receptor de picrotoxina o barbituratos. Los tres actúan para modular la actividad del canal de cloro.

Se ha involucrado a GABA en el desarrollo del kindling porque los bloqueadores del receptor de GABA, como la bicuculina y la penicilina, aceleran el kindling amigdalino y en cambio, los barbituratos y las benzodiazepinas que son agonistas no específicos de GABA, retardan la aparición de las convulsiones en el kindling. Los cambios encontrados en el receptor son específicamente en el sitio de las benzodiazepinas y se refieren a aumentos bilaterales en la unión (Bmáx) a benzodiazepinas en el hipocampo y la amígdala dos semanas después del establecimiento del kindling, que correlacionan con una inhibición del mismo. En el hipotálamo, la corteza ipsilateral y en el estriado la unión a benzodiazepinas y a picrotoxinas está reducida dos semanas después del kindling (Burnham 1990, Burnham 1986).

TRH y GABA coexisten en la células de la región dorsal de la médula espinal. Estudios con inmunohistoquímica han revelado la localización del TRH en las láminas II-IV de la región dorsal de la médula espinal. Después de un tratamiento con colchicina se ha observado que los cuerpos celulares están localizadas en la médula espinal y no en los núcleos del raphe de donde se originan las terminales TRHérgicas del asta ventral y lateral (Fleming 1994). Se sabe poco sobre la función del TRH en esta región, pero se le ha implicado con una acción excitadora sobre las neuronas del asta dorsal.

-*Glutamato*. Los aminoácidos excitadores son los principales neurotransmisores que aceleran la transmisión sináptica en el cerebro, e interactúan con los receptores a NMDA para ejercer su función biológica (McNamara 1990). Los receptores a n-metil-D-aspartato juegan diferentes papeles en la evolución del kindling. El kindling se desarrolla únicamente cuando el estímulo eléctrico activa los receptores a NMDA. La activación de estos receptores se da por un estímulo despolarizante, que puede ser provocado por acumulación de altas concentraciones intracelulares de  $K^+$ . La despolarización promueve que los receptores a NMDA liberen el bloqueo por  $Mg^{2+}$  y que esto prolongue la despolarización de la membrana celular (McNamara 1994). La administración de antagonistas competitivos de receptores a NMDA, bloquean el progreso del kindling (McNamara 1994).

**Acetilcolina:** La aplicación tópica de acetilcolina (Ach) o de colinomiméticos induce actividad paroxísmica y la infusión repetida de agonistas colinérgicos en la amígdala induce convulsiones. El carbacol produce el desarrollo progresivo de PD, micolonias y finalmente convulsiones generalizadas. Su efecto es dependiente de los intervalos apropiados de los estímulos; la topografía de la producción de PD es similar a la inducida por estimulación eléctrica, y su efecto puede bloquearse por antagonistas muscarínicos (como el sulfato de atropina, y la escopolamina).

**Opioides.** *Vindrola 1981* observaron un aumento en leu y met-enkefalinas en el cerebro de rata 24 horas después de establecido el kindling. El aumento de la leu-enkefalina está relacionado con la propagación de las postdescargas en las primeras etapas del kindling, mientras que los cambios en los niveles de la met-enkefalina es una consecuencia del establecimiento (*Vindrola 1981*). El papel de las enkefalinas en la epileptogénesis puede ser el de potenciar las acciones inhibitorias de GABA, ya que el antagonista de los opiáceos, la naloxona, facilita el kindling y tiene efecto sobre los receptores a GABA (*Dingledine 1978, Gruol 1980, Cupello 1981*). Asimismo, el kindling químico, inducido por inyecciones crónicas de dosis convulsivantes de pentilinetetrazol (PTZ) produce aumentos de 30 a 60% en la inmunoreactividad de Met y Leu-enkefalinas, en la amígdala, el estriado y el septum de ratas, 24 h después de la última inyección. El hipotálamo, la corteza y el hipocampo no muestran cambios. Los opioides también participan en la conducta depresiva en ratas con kindling amigdalino (*Frenk 1979*) o hipocampal (*Cotrell 1988*).

La infusión repetida de enkefalina en la amígdala inducen convulsiones (*Cain 1984*). La dinorfina i.c.v. suprime el efecto de los choques electroconvulsivos (*Bonhaus 1987*). La morfina aumenta la duración de dicha conducta, mientras que la administración de naltrexona o naloxona la atenúa, lo que involucra a los receptores  $\mu$  en este evento (*Cotrell 1987*). La administración crónica de estos antagonistas de opiáceos provoca aumentos en el número de los receptores y en la unión de los compuestos.

En cuanto a la síntesis de los opioides, los niveles de RNAm de prodinorfina, medidos por Northern blot, disminuyen en el giro dentado y en la región CA1 del hipocampo (*Rosen 1992*), mientras que aumentan en el estriado, después de estimulación por kindling en la corteza piriforme (*Wei-Xie 1989*). Es posible que la disminución de la biosíntesis de la dinorfina en el hipocampo durante el kindling favorezca la aparición de las convulsiones, ya que la administración i.c.v. del péptido eleva el umbral para la aparición de las crisis inducidas por flurothyl (*Wei-Xie 1989*). El RNAm de la proenkefalina, analizado por estudios de hibridación *in situ*, aumenta en el tubérculo olfatorio, en el núcleo arcuato y en el estriado ventral, después de una sola estimulación eléctrica en la amígdala y en la etapa V

después del establecimiento del kindling, aumenta en la corteza piriforme en un 39% y en la entorhinal en un 51% tanto en la región ipsi como contralateral al sitio de la estimulación (Rosen 1992). El hipocampo no muestra cambios (Shinoda 1991). Los cambios en la corteza piriforme persistieron dos semanas después de la aparición de las crisis generalizadas.

En las primeras etapas del kindling, la liberación de las encefalinas en la amígdala de ratas con una sola estimulación eléctrica se encuentra elevada al medirla por microdiálisis. En la etapa V del kindling en cambio, aparece una disminución progresiva de la recuperación de los péptidos. El efecto es máximo a los 20 minutos después de la estimulación eléctrica y los niveles regresan a condiciones basales después de 50 min de la crisis generalizada (Rocha 1994).

*Otros péptidos y proteínas.* la somatostatina, que tiene un probable papel inhibitorio, aumenta su contenido en el estriado al establecerse el kindling (Shinoda 1991, Monno 1993), el factor de liberación de la corticotropina por ECS y kindling amigdalino (Smith 1991), el TRH (Meyerhoff 1990); subespecies de la proteína cinasa C (en kindling hipocampal) (Ono 1994).

Cambios en la *expresión de genes*. La actividad convulsivante producida por ECS, kindling amigdalino y la administración de pentilinetetrazol induce modificaciones en el patrón de expresión genética de las células estimuladas. Ej: de los genes inmediatos tempranos *c-fos*, *c-jun* (Labiner 1993), *zif268* (Cole 1993); de las subunidades de los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje (Pei 1997); del factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y de su receptor *trk B* (principalmente en la capa granular del giro dentado del hipocampo [Benzon 1993, Kang 1996]); del factor de crecimiento neural NGF (Gall 1989, Isackson 1991), de péptidos como del TRH (Rosen 1992), de preprosomatostatina (Shinoda 1989), de preproencefalina aumenta en kindling en hipocampo de rata (Moneta 1990), o amigdalino (Shinoda 1989, Nadi 1991), mientras que la prodinorfina disminuye (Moneta 1990), la expresión de enzimas procesadoras (PC1 y PC2) y PAM en el hipocampo 1 hora después de la aparición de convulsiones por un ECS (Bhat 1993).

#### **I 5B 4. TRH y epilepsia**

Los primeros estudios que relacionan al TRH con la epilepsia se remontan a 1975 cuando Nemeroff *et al*, observan el efecto potenciador que tiene este péptido sobre las acciones anticonvulsivantes del pentobarbital en ratones. En 1981 Inanaga e Inoue *et al*, reportan que el análogo de TRH, el DN-1417, tiene un efecto antiepiléptico en los pacientes con el síndrome de Lennox



Gastaut (*Ueda 1983*), que es una epilepsia secundaria y en el tipo degenerativo de la epilepsia mioclónica.

Este análogo (el DN-1417) tiene un efecto activador sostenido en el SNC, es de dos a cinco veces más potente que el TRH y sólo tiene 1/30 de actividad para liberar tirotropina (*Fukuda 1980*). Posteriormente la inyección de tartrato de TRH se probó como tratamiento de la epilepsia severa, especialmente de espasmos infantiles (IS) (*Matsumoto 1987*). Se administró en forma intravenosa (i.v.) o intramuscular (i.m.), en dosis de 0.5-1.0 mg/día, por 1-4 semanas a pacientes con convulsiones tónicas generalizadas, parciales, tónico-clónicas generalizadas, con ausencias atípicas, con convulsiones atónicas y mioclónicas. El efecto fue la disminución de la frecuencia tanto de las convulsiones como de las postdescargas (*Matsumoto 1989*).

Investigando los factores que pueden alterar la respuesta en las convulsiones clínicas y en los parámetros electroencefalográficos en estos pacientes tratados con TRH, se encontró que la prolactina juega un papel importante en la efectividad clínica del TRH (*Matsumoto 1989*). La administración oral del análogo de TRH DN-1417 en dosis de 10,20,40 mg que son comparables a 0.5-2 mg administrado intramuscularmente, tiene menor efecto sobre la disminución de frecuencia de las convulsiones y de las postdescargas que la administración i.m. (*Inanaga 1989*).

Al comparar los efectos colaterales de la inyección de TRH en pacientes con epilepsia del tipo de espasmos infantiles, contra los efectos de ACTH, se ha visto que la velocidad de respuesta a TRH en niños con este padecimiento es significativamente más alta que en otro tipo de convulsiones; los efectos secundarios como el encogimiento del cerebro ó la depresión del sistema inmune de los pacientes son menos serios que los observados con ACTH. El TRH administrado como tartrato i.v. en una dosis de 0.5 a 1.0 mg/día disminuye los parámetros EEG y la duración de las PD.

Los estudios con animales se inician en 1984 cuando *Sato et al* utiliza el modelo experimental de epilepsia (kindling amigdalino) para observar que el DN-1417 inyectado i.v. tiene un efecto antiepiléptico en gatos estimulados eléctricamente, suprimiendo las convulsiones agudas y elevando su umbral convulsivo durante 9-50 días. La administración intraperitoneal del análogo de TRH antes de la electroestimulación del núcleo de la amígdala previene la evolución del kindling (*Sato 1984*). Estos efectos son transitorios, no están relacionados con la dosis y han mostrado una gran variación cuando la administración es periférica. En cambio, sí están relacionados con la dosis cuando la administración es intraventricular (*Sato 1985*). La administración i.v. del DN-1417 eleva el umbral electroconvulsivo disminuido por el pretratamiento

con  $\alpha$ -metiltirosina ( $\alpha$ -MT), un inhibidor de la biosíntesis de catecolaminas (Nakamura 1984), lo cual sugiere que el efecto probablemente sea mediado por dopamina. Además, el DN-1417 (de una manera dependiente de la dosis) eleva el umbral convulsivo disminuido por el pretratamiento con reserpina, que es un acelerador de la liberación de monoaminas (Nagai 1985).

El TRH ha recibido atención como una sustancia antiepiléptica endógena (Ogawa 1985, Sato 1985), involucrada en la formación, liberación y metabolismo de catecolaminas y acetilcolina.

Los efectos del TRH administrado en forma i.v. o i.m. son débiles y transitorios cuando se comparan con otros antiepilépticos convencionales, probablemente por la rápida degradación efectuada por la tiroiliberinasa sérica.

Otro análogo de TRH, el CNK-602A (N-(metil-5-oxo-3-tiomorfolinil)carbonil)-L-histidil-L-prolinamida, se ha utilizado con éxito para suprimir las "ausencias" y las convulsiones tónicas en las ratas que son espontáneamente epilépticas [(REE) por tener una doble mutación (zi/zi, tm/tm)]. La inyección es i.v. en dosis de 0.04, 0.2 y 1 mg/kg de peso con un volumen de 0.1ml/100 g de peso corporal. Este análogo aumentó significativamente la liberación de dopamina *in vivo* un 18 +/- 4.5% al comparar contra el valor basal, durante 2 horas (Renming 1992).

#### **I 5. B.5. TRH y kindling amigdalino.**

En 1984 Kubek y Sattin presentan evidencias de que las convulsiones generalizadas producidas por choque electroconvulsivo (ECS) y por kindling eléctrico, incrementan significativamente las concentraciones de TRH (medido por RIA) dos días después de la aparición de las convulsiones características del estadio V en la corteza piriforme, la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral completa del cerebro de rata. En un estudio subsecuente se observó el efecto del kindling químico sobre la concentración endógena de TRH en diferentes regiones del SNC. Así, seis meses después de una inyección mensual de pentilene-tetrazol (PTZ) a ratas previamente estimuladas eléctricamente (kindling), se encontró al TRH significativamente elevado dos días después de que el animal presentó una crisis de estadio V en las regiones de la corteza piriforme, la amígdala, el hipocampo y la corteza cerebral completa. No hubo cambios importantes en el TRH del hipotálamo total, el septum o el estriado (Kubek 1989).

Meyerhoff (1990) compara las concentraciones de TRH que se alcanzan cuando el animal se encuentra en el estadio II-III contra las del estadio V del kindling amigdalino y observa un aumento significativo en la corteza piriforme ipsi y contralateralmente al sitio de la estimulación eléctrica, así como elevaciones

importantes en la amígdala y en la corteza cingulada en el estadio V. No observaron cambios importantes en regiones como el bulbo olfatorio, el estriado, ni el septum en ninguna de las etapas o estadios analizados.

El hecho es que en este paradigma de estimulación eléctrica, la transmisión TRHérgica está activada en el hipocampo, la amígdala, y la corteza frontal, dados los cambios que se han encontrado en la concentración del péptido durante la epileptogénesis. Este aumento puede deberse a un efecto en la liberación del péptido. *Kubek et al (1994)* evidenciaron la liberación de TRH en rebanadas de hipocampo de cerebros de ratas después de recibir un tratamiento electroconvulsivo durante 3 días, y sacrificadas 12, 24 y 48 horas después de la última crisis generalizada. Las rebanadas de hipocampo fueron mantenidas en una solución con alta concentración de potasio (50 mM). La liberación de TRH fue dependiente de calcio (2.5 mM), y se comparó contra la liberación de rebanadas mantenidas en una solución de concentración de potasio normal (3.5 mM). La liberación de TRH en rebanadas de hipocampo con una solución de alto potasio y dependiente de calcio incrementó después de la aparición de las crisis generalizadas, lo que sugiere que las convulsiones favorecen la transmisión TRHérgica probablemente aumentando su liberación.

También existe evidencia de un aumento en la síntesis del péptido, ya que las elevaciones postictálicas de la concentración de TRH han sido precedidas por un aumento significativo en el RNAm del preproTRH, en particular las células granulosas del giro dentado son las que muestran aumentos dramáticos, por técnicas de hibridización *in situ* (*Fuson 1990*). Estudios de lesiones del hipocampo han mostrado que esta elevación de TRH necesita la vía perforante intacta. Estas observaciones, asociadas a estudios donde el tratamiento con ECS bloquea las convulsiones subsiguientes en ratas y eleva el umbral requerido para la epileptogénesis, hacen especular sobre el papel que tiene el TRH en la inhibición de convulsiones después de tratamientos con ECS (*Kubek 1994*).

Los aumentos en los niveles de RNAm de proTRH después del establecimiento del kindling amigdalino, tienen una distribución similar a la expresión de uno de los genes inmediatos tempranos *c-fos* después de la aparición de las convulsiones (*Rosen 1992*). Ambos RNAm tienen niveles basales indetectables en el giro dentado y en las cortezas piriforme, entorhinal y perirhinal; 1 hora después del establecimiento del kindling aumenta la inmunorreactividad de *c-fos* y 5 horas después de que los animales presentan crisis generalizadas se observa, por hibridización *in situ*, el aumento en los niveles de RNAm de TRH en dichas regiones. La colocalización es específica para las zonas límbicas, ya que el hipotálamo no es positivo antes ni después del kindling. Las células marcadas para el RNAm de TRH y para la inmunorreactividad de *c-fos* son las eferentes de

las regiones estudiadas. La corteza piriforme tiene proyecciones principales a muchas otras áreas como el bulbo olfatorio, la amígdala y las cortezas entorhinal y perirhinal. La corteza entorhinal es el principal punto de entrada al giro dentado y éste proyecta hacia la región CA3 del hipocampo; durante el kindling, por lo tanto, se encuentra activado un circuito neuronal en las áreas límbicas. Esto es importante porque estas regiones juegan un papel crucial en la aparición de convulsiones. Las cortezas piriforme y entorhinal se han propuesto como zonas epileptogénicas. La corteza perirhinal puede actuar propagando la actividad epileptiforme a otras zonas límbicas. El giro dentado regula la propagación de la actividad convulsivante de la corteza entorhinal al propio hipocampo y amplifica las postdescargas. Estas zonas están normalmente inhibidas, pero durante el kindling pueden tener tasas de disparo capaces de inducir el aumento en la transcripción de *c-fos* y TRH (Rosen 1993).

*Fos* y las proteínas relacionadas con *Fos*, pueden actuar en combinación con los miembros de la familia *Jun* de los factores de transcripción formando heterodímeros que utilizan motivos de "cierres de leucina", para influir la transcripción de otros genes blanco. La región promotora del gen de TRH, tal como se explicó antes, tiene un sitio de AP-1 donde el heterodímero *fos-jun* puede unirse y afectar la transcripción del péptido que a su vez podría estar modulando la actividad epileptiforme en las regiones estudiadas (Rosen 1993).

Las hormonas tiroideas afectan la sensibilidad de los animales a la aparición de convulsiones por ECS. La tiroidectomía eleva el umbral en ratas pero su efecto no está relacionado con los aumentos del RNAm de TRH encontrados en las zonas límbicas después del kindling amigdalino (Kim 1996).

Kubek (1993) encuentra (utilizando técnicas de hibridización *in situ* en ratas sometidas a kindling amigdalino), un aumento en los niveles de RNAm de proTRH desde las 3 horas después de la última estimulación eléctrica y de la aparición de las crisis generalizadas del estadio V, encontrando el pico de respuesta a las 6 horas *postictus* en la corteza piriforme, la amígdala, y de manera más notable en el giro dentado del hipocampo (CA4), así como una menor hibridización en las células CA3 y CA1. A las 24 horas los niveles regresaron a valores basales (Kubek 1993).

La unión de los receptores a TRH se encuentra significativamente disminuida en 23% y 30% a 39% en membranas preparadas de hipocampos contralaterales e ipsilaterales al sitio de la estimulación (respectivamente) de animales sometidos a kindling amigdalino 24 horas después de dos días consecutivos en que los animales presentaron convulsiones características del estadio V. También se encuentra reducción en la unión a receptores de TRH en membranas de

amígdala, (sitio inicial de la estimulación eléctrica) pero no en membranas de hipotálamo, pons-médula, o núcleo accumbens.

**Todos estos estudios apoyan el hecho de que el kindling amigdalino (estimulaciones subconvulsivas de baja intensidad y frecuencia) activa a las neuronas TRHérgicas y lo propone como un paradigma ideal para estudiar el papel de la enzima PPII en el funcionamiento de TRH en el SNC.**

## II B. OBJETIVOS.

- Definir si es la síntesis, el nivel de regulación de la actividad de la enzima PPII en el SNC.
- Identificar las células que presentan niveles de RNAm de PPII modificados por técnicas de hibridización *in situ*.

## III JUSTIFICACION.

La actividad de la enzima degradativa del TRH es modificable *in vitro* en adenohipófisis por diferentes efectores: PACAP, AMPcíclico, ésteres de forbol, y por el propio TRH. En condiciones fisiológicas como el hipotiroidismo e hipertiroidismo, la regulación tanto de la actividad como de los niveles de RNAm en estudios *in vivo* e *in vitro* está ya identificada y caracterizada.

A estos mismos paradigmas, la actividad de la enzima en regiones cerebrales como la corteza frontal y el hipotálamo resultó refractaria.

En cambio, utilizando como modelo el kindling amigdalino se ha evidenciado la regulación de la actividad de la enzima en el Sistema Nervioso Central.

La regulación de la enzima indica que su actividad puede contribuir a la intensidad de la transmisión del mensaje de su sustrato, el TRH, y dada la participación del péptido en diversas funciones biológicas, en la epileptogénesis y en la narcosis inducida por el etanol, se manifiesta como relevante la identificación del nivel de regulación de la enzima así como las células que responden a los estímulos fisiológicos suministrados, porque se podrían caracterizar el tipo de receptores y en consecuencia las posibles moléculas responsables de este evento.

Esto daría lugar a la búsqueda de estrategias y diseño de inhibidores como agentes terapéuticos que controlando la acción de la enzima reduzcan la intensidad de las convulsiones en epilepsia por ejemplo.

#### IV. METODOLOGIA.

##### **Manejo de animales en el kindling amigdalino.**

Ratas Wistar macho, de peso entre 250 y 270 g se mantuvieron con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (6 a.m. a 6 p.m. de luz), bajo condiciones constantes de temperatura y humedad, con libre acceso al alimento y al agua. Se anestesiaron con pentobarbital, se colocaron en un aparato estereotáxico y se implantaron con un electrodo bipolar de acero inoxidable (0.2 mm de diámetro) en el núcleo basolateral izquierdo de la amígdala del lóbulo temporal. El electrodo se fija con resina acrílica. Las coordenadas para implantar el electrodo son Bregma 2.8 mm, línea media 5 mm, ventral 8.5 mm (*Paxinos 1986*).

Una semana después de la cirugía, se estimularon diariamente (entre las 10 y 11 a.m.) con trenes de un segundo de pulsos eléctricos monofásicos de 1 ms de duración, con 60 Hz de frecuencia. La severidad de las convulsiones se midió registrando la actividad electroencefalográfica (EEG) que permite medir la duración y la frecuencia de las postdescargas que se producen durante la estimulación eléctrica, y clasificando los movimientos convulsivos del animal en las diferentes etapas del kindling según (*Racine 1972*).

Los animales control fueron implantados con el electrodo, pero no estimulados y se sacrificaron a la misma hora que los experimentales (n=5 para cada grupo).

Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 2, 6 y 24 horas después de alcanzar la etapa II o la V, sus cerebros extraídos y congelados a -70°C.

Se diseccionaron los cerebros congelados de las regiones del hipotálamo (excluyendo el área preóptica), amígdala y corteza piriforme, núcleo accumbens, corteza frontal, hipocampo. Se ha mostrado que estas regiones responden con cambios bioquímicos al estímulo eléctrico en la amígdala, contienen TRH en concentraciones elevadas, presentan actividad de la enzima PPII, RNAm de TRH (hipocampo, corteza piriforme, hipotálamo) y presentan cambios en la unión de los receptores a TRH al establecerse el kindling amigdalino (*Kubek 1993, de Gortari 1995*). Las regiones ipsi y contralaterales al sitio de la estimulación se unieron para extraer el RNA total y medir la expresión del RNAm de PPII o de TRH.

Otro grupo de animales se sacrificó 2h después de alcanzar la etapa II ó V del kindling amigdalino. Los cerebros se congelaron para posteriormente obtener rebanadas en un criostato y medir los cambios en la expresión de PPII y TRH por hibridización *in situ*.

### **Manejo de animales en la inyección i.p. de etanol.**

Ratas Wistar macho, con un peso entre 400 y 500 g, recibieron una sola inyección i.p. de etanol (3g/kg de peso) diluido 1:3 en una solución salina al 0.9% (Breese 1985, Morzorati 1993). El grupo de los animales control se inyectaron con solución salina. Los animales experimentales (n=24) y control (n=24) se sacrificaron el mismo día entre las 10:00 y 13:00 horas, por decapitación, 1, 6 y 24 horas después de la inyección. Los cerebros fueron removidos y congelados a -70°C, y la sangre colectada para la determinación de TSH. Los cerebros congelados fueron disecados en las mismas regiones que en el protocolo del kindling amigdalino. Una mitad de cada región se analizó para la cuantificación de TRH o para la actividad de la enzima PPII (izquierdo para TRH, derecho para PPII).

Otro grupo de animales se trataron de la misma manera pero se sacrificaron a los 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 16h, 20h, 24h después de la inyección intraperitoneal, se disecaron las mismas regiones cerebrales y se utilizaron para extraer el RNA total y medir la expresión del RNAm de PPII o de TRH.

### **Extracción de TRH.**

Las regiones cerebrales se homogenizaron en una solución de ácido acético al 20%. Se tomó una alícuota de 50µl para la determinación de proteínas. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 10 000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se secaron en un centrifugador bajo vacío, los residuos se resuspendieron en 1 ml de metanol y se mantuvieron en congelación toda la noche. Las muestras se centrifugaron 15 minutos a 10 000 rpm a 4°C y los sobrenadantes concentrados. El TRH se cuantificó por radioinmunoensayo (RIA) (Joseph 1979).

### **Radioinmunoensayo de TRH.**

El anticuerpo R2 utilizado para el ensayo fue caracterizado previamente (Joseph 1979). TRH iodinado con I<sup>125</sup> se preparó y purificó como está descrito. La mezcla de incubación consistió en 100 µl del anticuerpo R2 (diluido 1:10 000) en solución de RIA, y 100 µl de TRH I<sup>125</sup> y 100µl de la preparación del tejido conteniendo entre 500 y 1000 pg de TRH por cada 100µl. Después de 48 horas de incubación a 4°C se precipitó el complejo antígeno-anticuerpo con 1 ml de etanol absoluto. La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg (90%B/Bo). Se utilizaron estándares internos para el tejido hipotalámico y TRH sintético, y una curva estándar para corregir las variaciones intraensayo.

### **Determinación de proteínas.**

El tejido homogenizado en medio acidificado (ácido acético al 20%), se hidrolizó por 24 horas a temperatura ambiente con un volumen igual de 4.5N de NaOH. Las proteínas se cuantificaron de acuerdo al método de (Lowry 1951).

### **Preparación de las membranas celulares.**

Las regiones cerebrales se sonicaron en el 10% peso/vol de una solución de fosfatos pH 7.4. Esta mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y los residuos se resuspendieron en la mitad del volumen original de la solución de fosfatos y se centrifugaron durante 15 minutos, a 3000 rpm a 4°C y ambos sobrenadantes se mezclaron y centrifugaron durante 15 minutos a 10000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon y los residuos se resuspendieron en 200 µl de solución de fosfatos. Se tomó una alícuota para la determinación de proteínas.

### **Ensayo fluorométrico para medir la actividad de la enzima PPII.**

La mezcla de incubación incluyó 20 µl de la preparación de las membranas (1/10 del volumen original) (6 µg/µl de solución) con 50µl de 1mM inhibidores de proteasas (N-metilmaleimida, bacitracina), 10µl de una solución de 17µg/µl de dipeptidilaminopeptidasa IV (DAP IV) y 160µl de solución de fosfatos. La preparación control no incluyó membranas celulares. Las muestras se preincubaron 5 min a 37°C y entonces se agregaron a la mezcla 10 µl de p-glutamyl-histidil-prolin-β-naftilamida, como sustrato. Los tiempos de incubación fueron de 0, 15, 30 y 60 minutos. La reacción fue detenida con 250 µl de metanol absoluto a 4°C, después se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar la actividad enzimática midiendo a 410 nm. Se preparó una curva estándar con 0-800 pmol de β NA (0.01 µg/µl) (Wilk 1988).

### **Cuantificación de TSH.**

Las muestras de sangre (50 µl) se diluyeron con solución de radioinmunoensayo (150µl). 100 µl de anticuerpo contra TSH, en una dilución de 1:1 500 000 y 100 µl de TSH I<sup>125</sup> (7000 cpm/tubo) se agregaron y mezclaron. Las muestras se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente. 100 µl de anti IgG ( una dilución de 1:240) y 100 µl de suero normal de conejo (1:300 µl) se agregaron, mezclaron e incubaron por 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, 1 ml de poletilenglicol (0.04 g/ml de solución de RIA) se agregó, mezcló y centrifugó durante 30 min a 5000 rpm. Los sobrenadantes se aspiraron y los residuos se determinaron por conteo de radiaciones gamma (NIDDK).

### **Extracción de RNA total**

Los tejidos congelados fueron homogenizados en una solución de tiocianato de guanidina 4M (Chomczynski 1987). Después de dos extracciones con fenol y cloroformo/alcohol isoamílico, el RNA se precipitó con etanol absoluto. El residuo se lava con etanol al 70%, se secó y resuspendió en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC). El RNA fue cuantificado espectrofotométricamente por absorbancia a 260 nm ( relación 260/280 nm ≥ 1.8), donde 1 O.D. = 40 µg/ml.



### **Northern blot.**

El RNA total de los tejidos amígdala, hipocampo, n. accumbens, hipotálamo, corteza frontal de los cerebros de ratas sacrificadas 24 horas después de alcanzar la etapa II o V del kindling amigdalino, se analizaron por Northern blot. Muestras de 30 µg de RNA total se separaron por electroforesis (2.2 M formaldehído y 1.6% agarosa) (Maniatis 1982), se transfirieron a membranas de nylon por 36 horas y secaron a 80°C por 2 horas. Las membranas se prehibridizaron durante toda la noche a 42°C en una solución Denhardt's 10X con 50% de formamida, 50mM de fosfato de sodio (pH 6.5), 5X SSC, y 1mg de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. La hibridización se realizó por 24 horas a 42°C para la enzima, con una solución Denhardt's 5X, SSC 5X, 50% formamida, 200 mM de fosfato de sodio (pH 7.2), 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado por 10 minutos a 65°C y  $6.3 \times 10^8$  cpm de 1a sonda complementaria (cDNA) correspondiente al fragmento que incluye del nucleótido 1 al 2683 del cDNA de la PPII y marcada con  $^{32}\text{P}$  y la sonda de TRH (0.8Kb) que corresponde a la región codificada completa del cDNA de ppTRH de rata (Lechan 1986); 24 horas después se eliminó la solución de hibridación y se lavaron las membranas dos veces en una solución 2XSSC y 0.2% SDS por 30 minutos a t.a. y dos veces con 0.1X SSC, 0.2% SDS por 15 minutos a 52°C.

Para la reproducción fotográfica, los autorradiogramas se obtuvieron después de exponer al film por 3 días a -70°C (XOMat-Kodak, Rochester, NY) con las membranas. La señal autorradiográfica se analizó con un scanner, en combinación con un programa de computación para densitometría. Los datos se corrigieron para la variabilidad de la concentración que se cargó en el gel, como porcentaje de los valores obtenidos en la medición de la densidad de las fotografías del RNA total, se expresaron como área bajo la curva de la banda en el film sobre el área bajo la curva de la banda de la fotografía.

*Los resultados de la extracción del RNA total y de la estandarización de la técnica de Northern blot para cuantificar el RNAm de PPII y TRH en las diferentes regiones cerebrales se detallan a continuación:*

### **Extracción de RNA total de las diferentes regiones cerebrales a analizar.**

Para identificar la viabilidad del método de Northern blot en la cuantificación de los cambios de las diferentes regiones cerebrales de los niveles de RNAm de la PPII en las diferentes regiones del cerebro de interés: n. accumbens, hipotálamo, amígdala con corteza piriforme, corteza frontal e hipotálamo, se realizaron extracciones del RNA total de las regiones completas (incluyendo las porciones de ambos hemisferios) utilizando el método de tiocianato de guanidina (Chomczynski 1987).

La cantidad de RNA total extraído en estas zonas se muestra en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Concentración promedio de ARN total por región cerebral analizada**

Tejido	$\mu\text{g RNA /tejido}$	$\mu\text{g RNA/mg}$
Hipotálamo	$15.8 \pm 1.3$	$0.529 \pm 0.044$
N. accumbens	$39.2 \pm 7.4$	$0.885 \pm 0.164$
Corteza frontal	$87.8 \pm 20$	$0.73 \pm 0.168$
Amígdala/corteza piriforme	$46.3 \pm 8.1$	$0.45 \pm 0.078$
Hipocampo	$59.3 \pm 11$	$0.49 \pm 0.096$

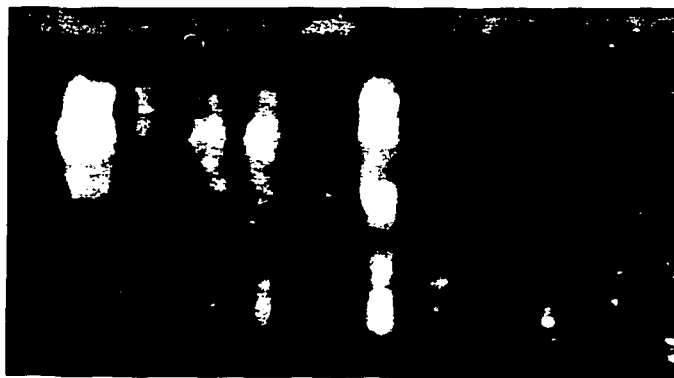
Los datos son un promedio de 4 extracciones  $\pm$  ESM

**Optimización del método de Northern blot para las regiones cerebrales.**

La concentración mínima requerida para identificar la señal correspondiente del RNAm de la PPII, por Northern blot, en estas regiones es de 10  $\mu\text{g}$  de RNA total.

Al hibridar el RNA total de estas regiones cerebrales con el cDNA de la PPII por Northern blot por 48 horas de exposición, se produjo una señal correspondiente al patrón reportado (Schauder 1994) (Figura 1.)

**Figura 1. Northern de PPII en regiones cerebrales de animales control.**



A B C D E F G H I J

carril Ay B:hipotálamo; C y D: n. accumbens; E y F: corteza frontal; G y H: amígdala; I y J: hipocampo

**Tabla 5. Análisis del RNAm de la PPII en cerebro de rata por Northern blot.**

Corteza frontal	100 ± %
Amígdala	41.2 ± 2.77 %
Hipocampo	65.2 ± 16.2 %
Núcleo accumbens	33 ± 5.3 %
Hipotálamo	21.3 ± 0.67 %

Los datos están en porcentaje de los valores obtenidos para la corteza frontal, tomándolo como el 100% ± ESM, n=3.

Posteriormente se analizaron con este método los cerebros de ratas sacrificadas 24 horas después de alcanzar la etapa II y V del Kindling, para detectar los cambios en los niveles de RNAm de TRH y PPII. Los resultados se muestran en la **Gráfica 1 en Resultados**.

Para los otros tiempos de sacrificio (2 y 6 horas) se decidió utilizar la técnica de RT-PCR. Esto por la dificultad para obtener suficiente RNA total de cada región cerebral para analizar por Northern blot y por la consecuente imposibilidad de repetición en caso de algún problema.

#### RT-PCR

Un  $\mu\text{g}$  de RNA total de los tejidos de cerebros de ratas sacrificadas 2h, 6h, después de llegar a la etapa II y V del kindling amigdalino, o de ratas sacrificadas a los 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 16h, 20h y 24h de la inyección i.p. de etanol, se diluyó en 10  $\mu\text{l}$  de agua tratada con DEPC, se desnaturalizó a 80°C por dos minutos. Se transcribió con la enzima transcriptasa reversa (MVL reverse transcriptase) (0.5  $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  de RNA), oligo dT (1 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  de RNA), ditiotretitol (DTT) 3 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  de RNA y desoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 3 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$  de RNA. La incubación se realiza a 37°C por dos horas.

Adicionando un oligonucleótido sintético específico con una secuencia complementaria al cDNA (5'-3') de la enzima PPII o del TRH y otro en sentido 3'-5', se amplificó el número de copias correspondiente al cDNA de la enzima o del TRH, con la enzima Taq polimerasa (0.5 $\mu\text{g}/\text{muestra}$ ). Al mismo tiempo se amplificó la señal de la enzima control (gliceraldehído 3-P deshidrogenasa).

Los transcritos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Se analizó por densitometría la señal correspondiente al cDNA teñido con bromuro de etidio, del TRH y de la enzima PPII y de la control.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de la PPII tienen la siguiente secuencia: el sentido 5' CTG-GAT-AGA-ATA-CAA-AAA-G 3' es y el de

la secuencia en antisentido es 5'GGA CAC CCA AAT AAT TGC T-3' que proporciona un fragmento de 400 pb.

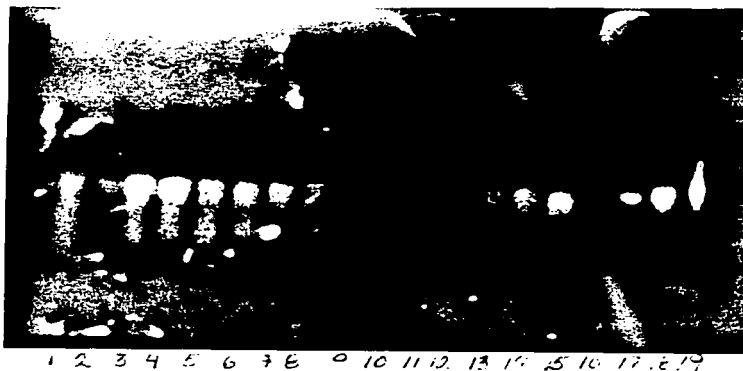
Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de la G<sub>3</sub>PDH tienen la siguiente secuencia: el sentido es 5'TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC 3' y el de la secuencia en antisentido es 5'CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3' que proporciona un fragmento de 900pb.

Los oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de la TRH tienen la siguiente secuencia: el sentido es 5'AAA-AGG-GAG-GAG-GAG-GAA-AA 3' y el antisentido 5'CTT-GAC-TTG-GGG-GAC-ATC-TG 3' proporcionando un fragmento de 214 pb.

La técnica es semicuantitativa y la modificación en la expresión del gen de la enzima se observa comparando con la expresión del gen de otra proteína que no cambia con el tratamiento a utilizar. Esta proteína es la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G<sub>3</sub>PDH), y para comprobar que no se modifica su expresión con el kindling, se realizó un Northern blot en el que se hibridó RNA total de corteza frontal, e hipotálamo de animales en etapa V del kindling.

Los resultados obtenidos en la corteza frontal fueron: los animales sham  $2.44 \pm 1.25$  (unidades de intensidad de la señal en el film/ la intensidad de la señal en la fotografía) y en los animales experimentales  $1.66 \pm 0.61$  (n=4).

**Figura 2. Northern blot de G<sub>3</sub>PDH**

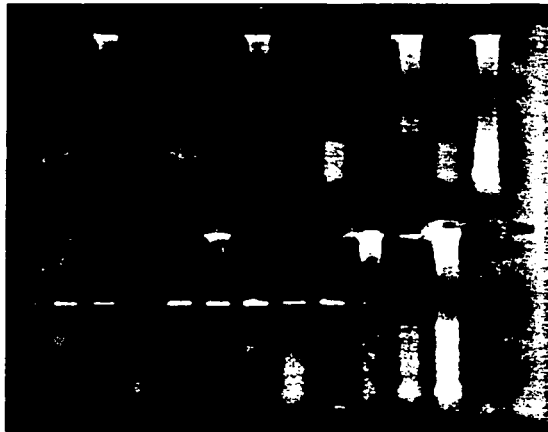


carril 1-4 corteza frontal (sham), 5-8 (kindling V); 9-12 hipotálamo (sham); 13-16 (kindling V); 17-19: RNA estándar

Para detectar los cambios en los niveles de RNAm de PPII por RT-PCR se realizaron curvas de calibración de la intensidad de la banda en la fotografía del gel contra volumen (3, 6 y 12  $\mu$ l) y concentraciones crecientes de cDNA correspondiente a 0.5, 1, 2 y 4  $\mu$ g de RNA total, y aumentando el número de ciclos para la actividad de la enzima Taq polimerasa.

A 25 ciclos no pudo detectarse la banda correspondiente al fragmento de la enzima PPII con ninguno de los volúmenes y concentraciones de cDNA, mientras que el fragmento de la G<sub>3</sub>PDH se observó en prácticamente todos los carriles (a excepción de los correspondientes a 2 y 4  $\mu$ g de RNA), utilizando 12  $\mu$ l de cDNA.

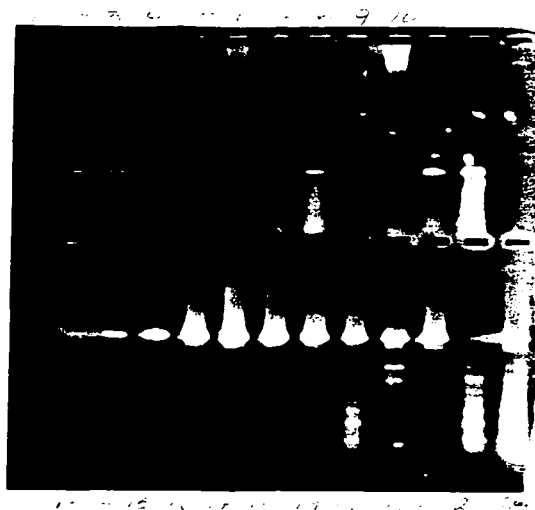
**Figura 3. RT-PCR de PPII y G<sub>3</sub>PDH con 25 ciclos.**



Gel superior RT-PCR de PPII  
Gel inferior RT-PCR de G<sub>3</sub>PDH. Carriles 13-16, 3 $\mu$ l de cDNA y 0.5,1,2,4 $\mu$ l de RNA total; 17-20, 6 $\mu$ l de cDNA; 21-24, 12  $\mu$ l de cDNA

A 30 ciclos se detectó débilmente el fragmento de la PPII en todos los carriles, y el de G<sub>3</sub>PDH se observó claramente en todas las concentraciones de RNA utilizadas.

**Figura 4 RT-PCR de PPII (30 ciclos) y (35 ciclos).**



Gel superior PPII a 30 ciclos. Carriles 1-4: 3 $\mu$ l de cDNA y 0.5, 1, 2, 4 $\mu$ g de RNA total; 5-8: 6 de cDNA; 9-12: 12  $\mu$ l de cDNA.  
Gel inferior PPII a 35 ciclos. Mismas condiciones

**Tabla 6. Intensidad de la señal del fragmento de la PPII amplificado por PCR con 30 ciclos.**

3 $\mu$ l de cDNA		6 $\mu$ l de cDNA		12 $\mu$ l de cDNA	
$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad
0.5	3657	0.5	2492	0.5	2551
1	5199	1	6058	1	6013
2	4307	2	4603	2	3851
4	1649	4	2390	4	1500
$r = -0.7903$	$p = 0.210$	$r = -0.3736$	$p = 0.626$	$r = -0.565$	$p = 0.435$

La concentración de los oligos de la PPII es de 15 pmol (17.7 ng)

A 35 ciclos, la PPII se observó claramente, pero la G<sub>3</sub>PDH estuvo en los niveles de saturación

**Tabla 7. Intensidad de la señal del fragmento de la PPII amplificado por PCR durante 35 ciclos**

6 $\mu$ l de cDNA		12 $\mu$ l de cDNA	
$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad
0.5	11630	0.5	13264
1	12559	1	8624
2	14199	2	10561
4	7181	4	3425
$r = -0.7136$	$p = 0.286$	$r = -0.8904$	$p = 0.110$

[PPII]15 pmol/muestra

Las correlaciones negativas, indican que hay una saturación de la actividad de la enzima con las concentraciones más altas. Por ello se hicieron nuevamente correlaciones sólo con las concentraciones de 0.5, 1, 2  $\mu$ g de RNA, descartando la de 4  $\mu$ g. Los valores fueron los siguientes para la PPII (**Figura 4**).

**Tabla 8. Correlaciones de la intensidad de la señal de la PPII con diferentes concentraciones de RNA total.**

30 ciclos			35 ciclos	
3 $\mu$ l de cDNA	6 $\mu$ l de cDNA	12 $\mu$ l de cDNA	6 $\mu$ l de cDNA	12 $\mu$ l de cDNA
$r = 0.2407$	$r = 0.4253$	$r = 0.1895$	$r = 0.9995 *$	$r = -0.4155$
$p = 0.845$	$p = 0.720$	$p = 0.879$	$p = 0.020 *$	$p = 0.727$

**Intensidad de la señal del fragmento de la PPII y del de G<sub>3</sub>PDH amplificados simultáneamente por PCR durante 35 ciclos por PCR**

En función de que la correlación significativa se encontró a 35 ciclos con 6  $\mu$ l de cDNA, estas fueron las condiciones que se utilizaron para amplificar ahora en forma conjunta, el fragmento de la PPII y de la G<sub>3</sub>PDH. Sin embargo, puesto que a 35 ciclos la amplificación de G<sub>3</sub>PDH se encontró saturada desde 0.5  $\mu$ g de RNA, y a 30 ciclos no se detectó en forma clara la PPII pudiéndose correr el riesgo de perder la señal en algunas muestras, la amplificación simultánea de los fragmentos de las dos proteínas se realizó disminuyendo la concentración de los oligos de G<sub>3</sub>PDH de 15 ng a 10 ng a 35 ciclos.

**Figura 5 PPII y G<sub>3</sub>PDH amplificados en conjunto a 35 ciclos.**



Banda superior G<sub>3</sub>PDH, inferior PPII Carriles 1-3 3 $\mu$ l de cDNA y 0.5, 1, 2  $\mu$ g de RNA total: 4-6: 6 de cDNA, 7-9 12  $\mu$ l de cDNA.



Tabla 9. Intensidad de la señal de la PPII y G<sub>3</sub>PDH amplificadas en conjunto.

**PPII (15pmol/muestra) (17.7 ng).**

3 $\mu$ l de cDNA		6 $\mu$ l de cDNA		12 $\mu$ l de cDNA	
$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad
0.5	0.467	0.5	0.686	0.5	0.836
1	0.611	1	0.743	1	0.851
2	0.662	2	0.817	2	0.802
$r = 0.8966$	$p = 0.292$	$r = 0.9934$	$p = 0.073$	$r = -0.804$	$p = 0.405$

**G<sub>3</sub>PDH ( 10 ng)**

3 $\mu$ l de cDNA		6 $\mu$ l de cDNA		12 $\mu$ l de cDNA	
$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad	$\mu$ g de RNA	Intensidad
0.5	0.088	0.5	0.273	0.5	0.128
1	0.302	1	0.470	1	0.756
2	0.293	2	0.546	2	0.464
$r = 0.7311$	$p = 0.478$	$r = 0.9045$	$p = 0.281$	$r = 0.3653$	$p = 0.762$

Las correlaciones más cercanas a 1 fueron las de 6  $\mu$ l para la amplificación de los dos cDNAs, sin embargo no fueron significativas debido a que el número de puntos es bajo ( $n=3$ ). Esto indica que es factible observar cambios en la amplificación de los fragmentos estudiados en esas condiciones, y que se puede utilizar como curva de calibración pero teniendo en mente que el error al interpolar valores experimentales puede ser alto. Para los experimentos subsiguientes, se utilizó la concentración de 1  $\mu$ g de RNA total para iniciar la transcripción, y 1/5 del volumen de reacción (6  $\mu$ l de cDNA) para la PCR, 15 pmol de los oligos de PPII y 10 ng de G<sub>3</sub>PDH.

**Preparación de las sondas.**

Para la Hibridización *in situ* de PPII se diseñaron dos cincuentámeros con base en la secuencia del ADNc de la enzima (Schauder 1994) obtenido de la rata. Estas sondas comprenden de los nucleótidos 207 al 256 (oligo A) y del 690-739 (oligo C). Para el diseño de los oligonucleótidos, se utilizó el programa de cómputo Oligo (NSB), que considera parámetros como la estabilidad del híbrido y, la posibilidad de que el oligonucleótido hibride sobre sí mismo. De los fragmentos que resultaron candidatos se verificó que tuvieran una proporción de GC entre el 50 y 65% y que hibridaran en la región traducida del ADNc (Schauder 1994). Se

TRH  
FALLA DE CORRIENTE

seleccionaron los oligonucleótidos que al compararlos con la base de datos "Gene-Bank" no presentarían homología significativa con las otras secuencias presentes con la excepción de la de la PPII. Estas características llevaron a escoger dos oligonucleótidos (A y C) que se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de macromoléculas del IBT, añadiéndose al final un paso de eliminación de exceso de sales.

La sonda para la identificación del RNAm de TRH es un cincuentámero sintetizado químicamente en el IBT comprendido entre los nucleótidos 300 al 560.

**Marcaje de las sondas.**

Los oligómeros se marcaron en el extremo 3' con  $\alpha$  ( $^{35}\text{S}$ ) dATP (actividad específica 1000 Ci/mmol (Amersham) para la hibridación *in situ*, ó bien con  $\alpha$  ( $^{32}\text{P}$ ) dATP (actividad específica 3000 Ci/mmol para el Northern blot con la enzima desoxirribonucleotidil terminal transferasa (25 U/ $\mu\text{l}$ ). Una mezcla de 2 pmol de oligómero, 3  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora para la enzima, 4.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{CoCl}_2$ , 5mM, 50  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha$  dATP  $^{35}\text{S}$  ó 50  $\mu\text{Ci}$  de  $\alpha$  dATP  $^{32}\text{P}$ , agua para un volumen final de 15  $\mu\text{l}$  y al final se agregó 1.5  $\mu\text{l}$  de la enzima. La reacción se incubó por 30 minutos a 37°C, se detuvo con 15  $\mu\text{l}$  de Tris-EDTA (TE) (Maniatis 1982) y 1  $\mu\text{l}$  se utilizó para medir el porcentaje de incorporación del nucleótido marcado a los oligómeros. El resto de la reacción se precipitó con 2 $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5M pH 8; 3 $\mu\text{l}$  de RNAt (10mg/ml); 3.5  $\mu\text{l}$  de NaCl 4M y 102  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto a -70°C por una hora. Se centrifugó a 15 000 g por 30 minutos a 4°C, el precipitado se lavó con 200  $\mu\text{l}$  de etanol 70% en agua y se centrifugó nuevamente a 15 000 g por 10 minutos a 4°C; el precipitado se resuspendió en 25  $\mu\text{l}$  de TE con 10mM DTT (ditiotreitól). Se determinó el porcentaje de recuperación y la actividad específica.

**Hibridización *in situ*.**

Los cerebros de las ratas sacrificadas 6h después de la etapa II y V del kindling amigdalino se rebanaron en 12  $\mu\text{m}$  a -20°C, se montaron en portaobjetos tratados con aminoalkilsilano y se fijaron transfiriéndolos en secuencia a través de un baño con solución de fosfatos 1X (PBS) y 4% de formaldehído por 15 minutos; lavados en PBS por 10 minutos; tratados con una solución de SSC 4X con anhídrido acético 0.25% y trietanolamina (TEA) 0.1 M (pH 8.0) por 10 minutos; lavados con 2X SSC por 2 minutos, deshidratados con series de etanol al 75%, 80%, 95% y 100% por dos minutos en cada uno; rehidratados con etanol al 95% por dos minutos cada uno. Todo el tratamiento se efectuó a t.a.

Hibridación con los oligonucleótidos. Sobre cada corte se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de una solución de hibridación de 4X SSC, 50% de formamida desionizada, 1X de solución Denhardt's, 10% de sulfato de Dextrán, 500 g/ml de esperma de salmón

desnaturalizado por 10 minutos a 95°C y 100 µg/µl de RNAt, 50mM de DTT y 1pmol/ml de cada oligonucleótido marcado, con una actividad específica entre 6 y 9 X10<sup>8</sup> cpm/ µg. Los cortes se cubrieron con parafilm para que no se evapore la solución de hibridación. Se mantuvieron por 12 horas a 42°C en una cámara húmeda. Después de este tiempo, se lavaron las laminillas en una solución 1X SSC a t.a. por 15 minutos; dos veces con 1X SSC 50% formamida por 30 minutos a 42°C y 4 veces con 0.1X SSC y 0.2% de SDS por 30 minutos a 52°C. Al final de los lavados, los tejidos se deshidrataron con series de etanol al 75, 80, 95 y 100% y se dejaron secar. El análisis macroautorradiográfico se realizó por la exposición a una película Biomax MR, Kodak por 21 días. Después se reveló.

La detección del RNAm de la PPII o TRH a nivel celular se realizó por la exposición de los tejidos directamente a una emulsión fotográfica (Amersham). La emulsión se fundió a 42°C por 10 minutos en el cuarto oscuro. Con el propósito de obtener una capa homogénea de emulsión sobre el tejido se eliminaron los grupos y las burbujas mecánicamente. Los cortes se sumergieron en la emulsión por 3 segundos y se dejaron secar por 3 horas a t.a. en el cuarto oscuro. Se expusieron a 4°C por 35 días y se revelaron. Para el revelado se secaron los tejidos a t.a. por media hora en la oscuridad, se sumergieron en el revelador (D19 de Kodak) por 3 minutos, con el agua 1 minuto y con el fijador (GBX, Kodak) por 6 minutos, y posteriormente se cambió el fijador y se mantuvieron en él por otros 3 minutos. Los cortes se lavaron con abundante agua con agitación constante 2 veces por 15 minutos. El revelador, el fijador y el agua se mantuvieron entre 15 y 18°C durante todo el proceso. Posteriormente los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Tinción con hematoxilina eosina. Los cortes de tejido se sumergieron en etanol al 96% por un minuto, en agua por un minuto, en hematoxilina por 5 minutos, en agua hasta eliminar el exceso de colorante, en etanol absoluto con HCl al 1% dos veces, en agua por un minuto, en eosina tres veces rápidamente, en agua hasta eliminar el exceso de colorante, en etanol 96% por un minuto, en etanol absoluto por un minuto dos veces y en xilol por un minuto dos veces cada uno. Los cortes se sacaron uno por uno y se les agregó una gota de Permout para montar el cubreobjetos.

### **Análisis estadísticos.**

Para las comparaciones de los valores de los grupos experimentales contra los controles se realizaron utilizando la prueba de T de student con un significancia de  $p < 0.05$ .

Para comparar los cambios de los valores de los grupos a lo largo del tiempo se utilizó el Análisis de Varianza.

## V. RESULTADOS

### Extracción de RNA total de las diferentes estructuras a analizar.

Para identificar la viabilidad del método de Northern blot en la cuantificación de los cambios de los niveles de RNAm de la PPII en las diferentes regiones del cerebro de interés: n. accumbens, hipotálamo, amígdala con corteza piriforme, corteza frontal e hipotálamo, se realizaron extracciones del RNA total de las regiones completas (incluyendo las porciones de ambos hemisferios) utilizando el método de tiocianato de guanidina (*Chomczynsky 1987*).

Los resultados se detallan en: **METODOLOGIA**.

Posteriormente se analizaron con este método los cerebros de ratas sacrificadas 24 horas después de alcanzar la etapa II y V del Kindling, para detectar los cambios en los niveles de RNAm de TRH y PPII. Los resultados se muestran en la **Gráfica 1**.

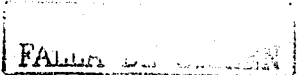
Para los otros tiempos de sacrificio (2 y 6 horas) se decidió utilizar la técnica de RT-PCR. Esto por la baja proporción en que se encuentra el RNAm de la PPII con respecto al RNA total de cada región cerebral y por la consecuente imposibilidad de repetición.

### Optimización de la técnica de RT-PCR (Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa), para detectar RNAm de la enzima PPII.

Dada la baja concentración de RNAm de PPII en las diferentes regiones cerebrales (entre 130 y 1076 fg/ $\mu$ g de RNA total) (*Lin 1998*), se decidió utilizar la técnica de RT-PCR cuyos requerimientos son de 1 $\mu$ g de RNA total y permite amplificar la señal del RNAm a estudiar hasta niveles detectables.

La técnica es semicuantitativa y la modificación en la expresión del gen de la enzima se observa comparando con la expresión del gen de otra proteína que no cambia con el tratamiento a utilizar. Esta proteína es la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G<sub>3</sub>PDH), y para comprobar que no se modifica su expresión con el kindling, se realizó un Northern blot en el que se hibridó RNA total de corteza frontal, e hipotálamo de animales en etapa V del kindling.

Los resultados de la estandarización de la técnica para la cuantificación de RNAm de la PPII y TRH se detallan en el apartado de: **METODOLOGIA**, e incluyen, el Northern blot de la enzima Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa en regiones cerebrales de animales sometidos a kindling amigdalino, como evidencia de que



su expresión no presenta cambio en este paradigma, y así poder utilizarla como referencia de las alteraciones en la expresión de la PPII y TRH por RT-PCR.

Además la curva de calibración de intensidad de la banda correspondiente al cDNA de la PPII y G<sub>3</sub>PDH vs el volumen inicial de cDNA y vs la concentración de RNA total a diferentes ciclos de amplificación de la señal utilizando la actividad de la Taq polimerasa.

En función de los resultados de optimización de la técnica de RT-PCR, se utilizó la concentración de 1 µg de RNA total para iniciar la transcripción, 1/5 del volumen de reacción (6 µl) de cDNA para la PCR, 15 pmol de los oligos de PPII y 10 ng de G<sub>3</sub>PDH a 35 ciclos.

**Modelo del Kindling Amigdalino.**

Kindling. Los animales que alcanzaron la etapa II del kindling necesitaron 7 ± 0.332 número de estimulaciones. Los que llegaron a la etapa V necesitaron 15 ± 0.829 número de estimulaciones. La duración y frecuencia de las postdescargas aparecen en la **Tabla 10.**

**Tabla 10. Parámetros electrofisiológicos de los animales durante el Kindling.**

	Duración en seg.	Frecuencia en Hz
<b>Etapla II</b>	12 ± 2.2	29 ± 2.2
<b>Etapla V</b>	78 ± 12	34 ± 3.0

Los resultados son el promedio ± el error estándar de la media. n = 10

Contenido de RNAm de TRH y PPII.

Se analizaron las regiones de amígdala, corteza frontal e hipocampo (ipsi y contralateral en conjunto) en los cerebros de los animales sacrificados 2, 6 y 24 horas después de presentar características electrográficas y conductuales de la etapa II y V del Kindling amigdalino.

Los primeros experimentos de análisis de los niveles de RNAm de TRH tuvieron como objetivo corroborar los cambios ya reportados, y validar así el modelo a utilizar. *Knoblack (1997)* detectó, por hibridización *in situ*, un pico de la expresión del RNAm de TRH a las 3 horas postictálicas en la etapa V en amígdala, corteza piriforme, y en el hipocampo, decreciendo a niveles basales a las 24 horas. Este dato aparece en las **(Gráficas 1-4).**

El análisis de los cerebros de animales que alcanzaron la etapa V y fueron sacrificados a las 24 horas se realizaron por Northern blot, y los de 2h y 6h de sacrificio por RT-PCR.

Los resultados en los niveles de RNAm de TRH por Northern y RT-PCR resultaron comparables con los reportados (**Gráfica 1**).

Algunos se analizaron por Northern blot (24 horas) (**Gráfica 1**) y una vez optimizado el método de RT-PCR se utilizó para medir los cambios en los niveles de RNAm de PPII y TRH en los animales sacrificados a las 2 y 6 horas (**Gráficas 2,3,4**).

En la **Corteza Frontal** se encontraron sólo valores significativamente elevados de RNAm de la enzima que degrada al TRH en el grupo de animales sacrificados a las 24 horas (140 %) de alcanzar la etapa II, al comparar contra el control (100%), y una disminución significativa (más o menos a 60% de los valores normales) a las 24 horas de alcanzar la etapa V (**Gráfica 2**).

Al medir el contenido de RNAm de TRH se encontró un aumento significativo en el grupo de animales sacrificado a las 24h después de alcanzar la etapa II de casi un 300% y a las 2 h después de llegar a la etapa V (405%) (**Gráfica 2**).

En la **amígdala**, los cambios en el contenido de RNAm de PPII se encontraron en el grupo experimental de 6h de alcanzar la etapa II (+298%\*) y una disminución significativa de (más o menos el 50%) desde las 2 horas, que se mantiene a las 24 horas después de alcanzar la etapa V (**Gráfica 3**).

El contenido de RNAm de TRH en la amígdala incrementó en un 288% en el grupo sacrificado 2 h después de llegar a la etapa V (**Gráfica 3**).

En el **hipocampo**, se encontraron aumentos en el contenido de RNAm de la enzima PPII en el grupo sacrificado a las 6 horas de llegar a la etapa II, una disminución a las 2h en la etapa V y niveles basales a las 24 h (**Gráfica 4**).

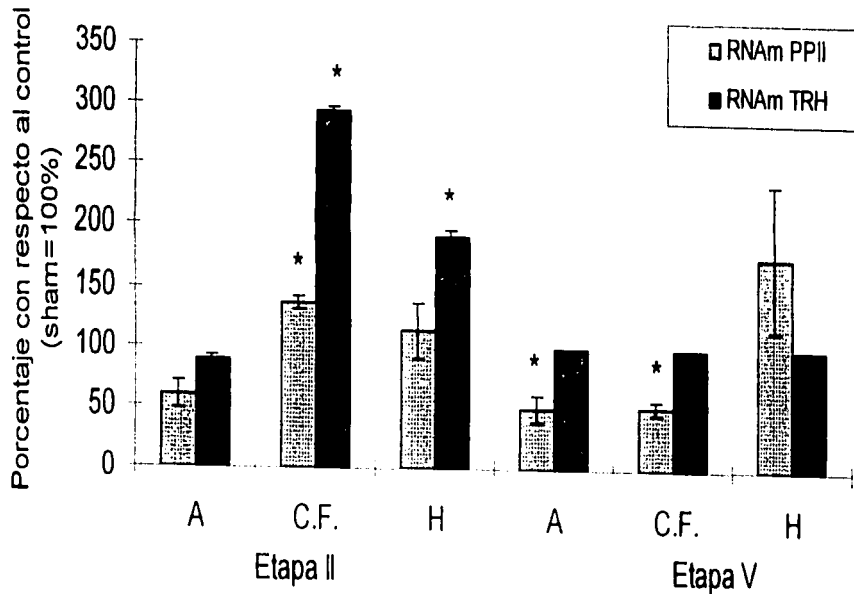
El contenido de RNAm de TRH aumentó en el grupo de 24 horas después de la etapa II (casi 200%) y en el de 2h después de etapa V a 593% el valor de los animales control (**Gráfica 4**).

### **Hibridización *in situ***

**-TRH, en cerebros de animales sacrificados 6 horas después de la etapa II del Kindling amigdalino.**

Con 5 días de exposición al film, en los animales control, se observó una distribución del RNAm de TRH limitada. Apareció una señal importante en la zona

Gráfica 1. Cambios en el contenido de RNAm de PPII y TRH durante el kindling.

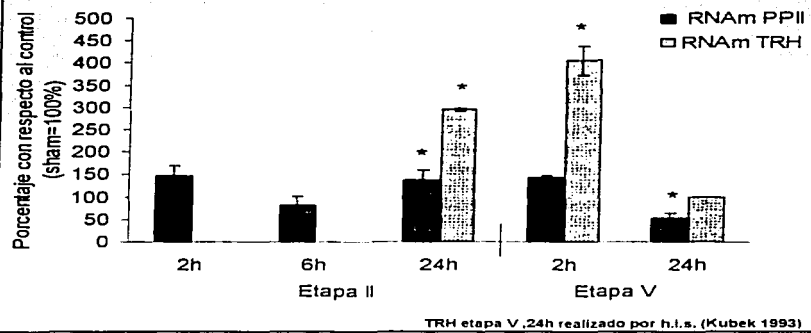


TRH etapa V realizado por h.i.s. y publicado por Kubek 1993  
 A= amígdala; C.F.= corteza frontal; H.= hipocampo. \* $p < 0,05$

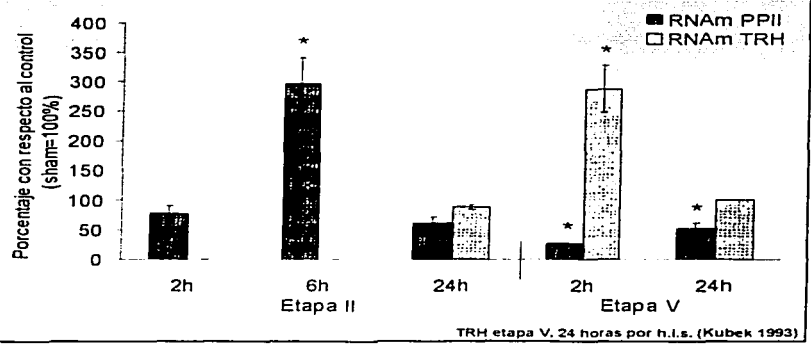
TESIS DE GRADUACIÓN  
 FALTA DE ORIGEN

TESIS  
FALLA DA JERVEN

Gráfica 2. Corteza frontal: cambios en contenido de RNAm de PPII y TRH durante el kindling, utilizando Northern blot (24h) y RT-PCR (2,6h)

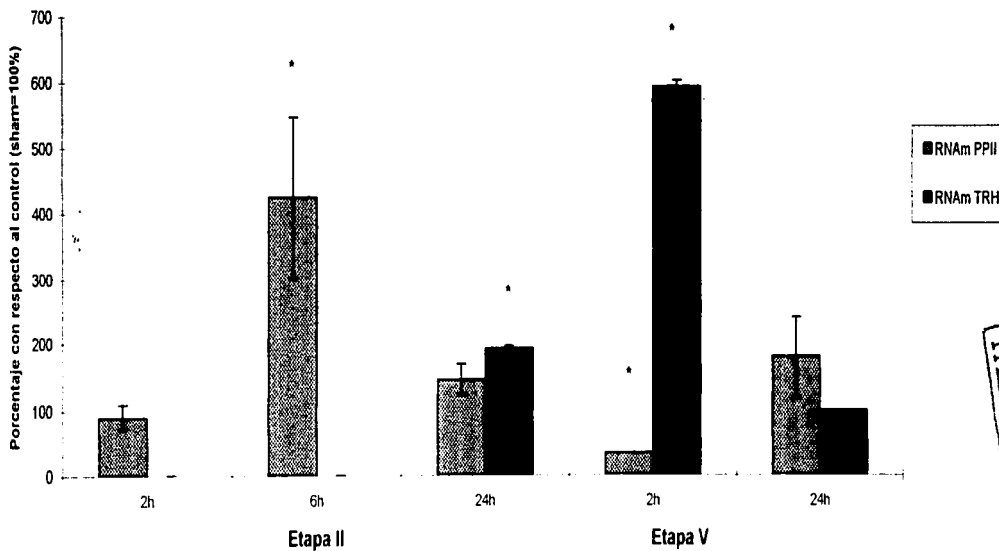


Gráfica 3. Amígdala: cambios en contenido de RNAm de PPII y TRH durante el kindling, utilizando Northern blot (24h) y RT-PCR (2,6h)





**Gráfica 4. Hipocampo: cambios en contenido de RNAm de PPII y TRH durante el kindling, utilizando Northern blot (24h) y RT-PCR (2,6 h)**



TRH etapa V, 24 horas por h.i.s. (Kubek 1993)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN  
NO

del hipotálamo. El núcleo paraventricular, el reticular talámico, el hipotálamo lateral y dorsomedial se observaron claramente en estos animales. La señal en la zona de la corteza cerebral y del hipocampo resultó débil en la mayoría de las secciones analizadas.

Seis horas después de alcanzar la etapa II del kindling, se observó un incremento en la señal del RNAm de TRH en la corteza piriforme, en la amígdala, en la corteza frontal, el hipotálamo y en el hipocampo. Aparecieron cambios significativos en mayor cantidad de zonas en las regiones ipsilaterales que en las contralaterales. Se obtuvieron cambios significativos en la corteza piriforme, la amígdala, la corteza frontal, el hipocampo, y el hipotálamo de la región ipsilateral (**Gráfica 5**). Se encontraron aumentos significativos tanto ipsi como contralateralmente sólo en el hipotálamo y en el hipocampo (**Gráfica 6**). El n. accumbens no presentó cambios.

**-PPII en cerebros de animales sacrificados 6 horas después de alcanzar la etapa II del kindling amigdalino.**

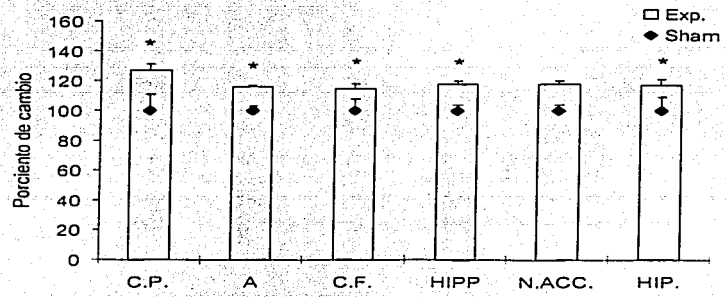
**Oligonucleótidos.** Los tejidos hibridados con los oligonucleótidos se mantuvieron por tres semanas en exposición al film y 2 meses en autorradiografía por emulsión, después de este tiempo se revelaron. El análisis de estos resultados se realizó con los tejidos emulsionados que permiten identificar el tipo celular que está respondiendo al estímulo del kindling.

Se encontraron cambios significativos en las células CA1 del hipocampo tanto ipsi ( $371 \pm 87\%$ ) (**Lámina 1**) como contralateralmente ( $277 \pm 47\%$ ) al sitio de la estimulación; en las células CA2 del hipocampo, ipsi ( $225 \pm 34\%$ ) (**Lámina 2**) y contralateralmente ( $230 \pm 25\%$ ). La corteza piriforme mostró un aumento significativo sólo en la región ipsilateral ( $466 \pm 83\%$ ) (**Lámina 3**). Estos resultados coinciden con la dimensión de los cambios observados por RT-PCR en esta hora de sacrificio (**Gráficas 7y 8**).

La expresión de la PPII en amígdala no presenta diferencia significativa en ninguna de las dos regiones (ipsi o contralateral), lo que hace suponer que los cambios observados por RT-PCR se deben a las modificaciones que presenta la corteza piriforme, ya que para analizarlos por dicha técnica, se disectan juntos (**Gráfica 3**).

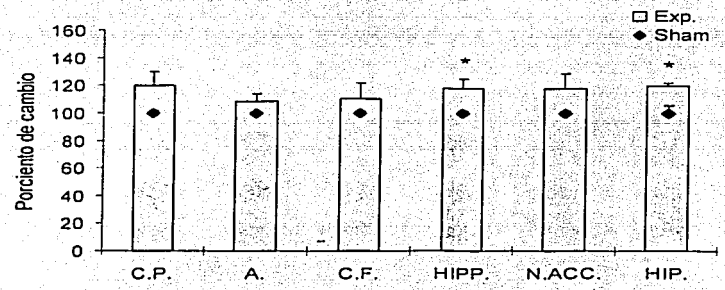
La relevancia de estos resultados radica en que se han identificado las células hipocámpales que están siendo estimuladas para la expresión de la enzima PPII durante las primeras etapas del kindling. Este aumento en concentración de RNAm coincide con el aumento observado en la actividad de la enzima en la etapa II (en animales sacrificados a las 24 horas), lo que indica que el evento de regulación de la enzima en esta etapa es a nivel de su síntesis. Aunque no hay

Gráfica 5. Contenido de RNAm de TRH en la etapa II del kindling (6h) por h.i.s. Cambios ipsilaterales



Resultados expresados como la media del porcentaje de cambio  $\pm$  e.e.m. (n=6) con respecto a los valores sham (sham=100)

Gráfica 6. Contenido de RNAm de TRH en la etapa II del kindling (6h), por h.i.s. Cambios contralaterales.



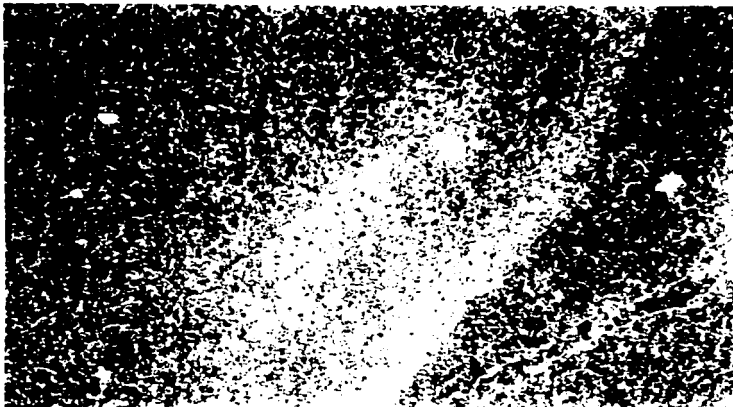
Resultados expresados como la media del porcentaje de cambio  $\pm$  e.e.m. (n=6) con respecto a los valores sham (sham=100)

LAMINA 1

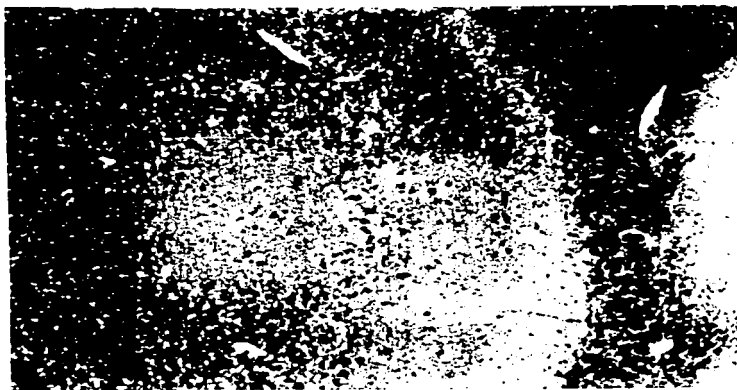
FALLA

-506-

**RNAm de la enzima PPII en las células CA1 del hipocampo en animales sacrificados 6 horas después de alcanzar la etapa II del kindling amigdalino.**



experimental



sham

LAMINA 2

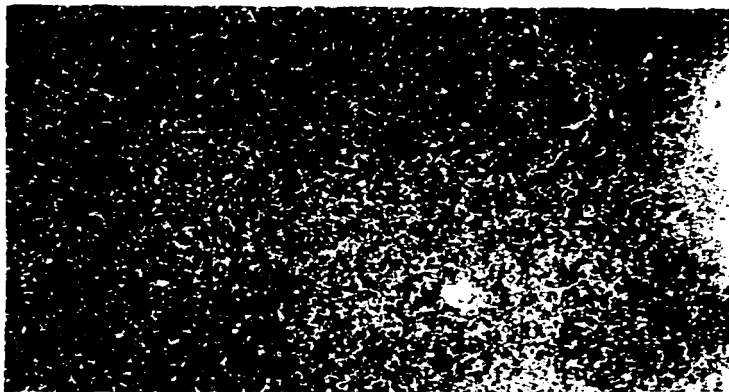
ENCUENTRO

-30c-

**RNAm de la enzima PPII en las células CA2 del hipocampo en animales sacrificados 6 horas después de alcanzar la etapa II del kindling amigdalino.**



experimental



sham

1985  
FALL

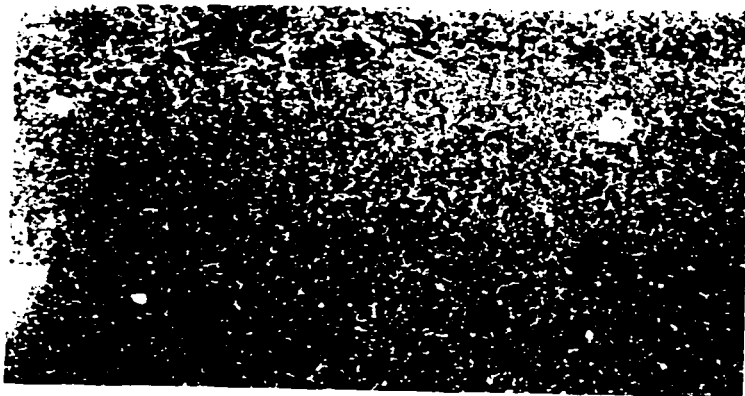
-50d-

LAMINA 3

**RNAm de la enzima PPII en las células de la corteza piriforme en animales sacrificados 6 horas después de alcanzar la etapa II del kindling amigdalino.**

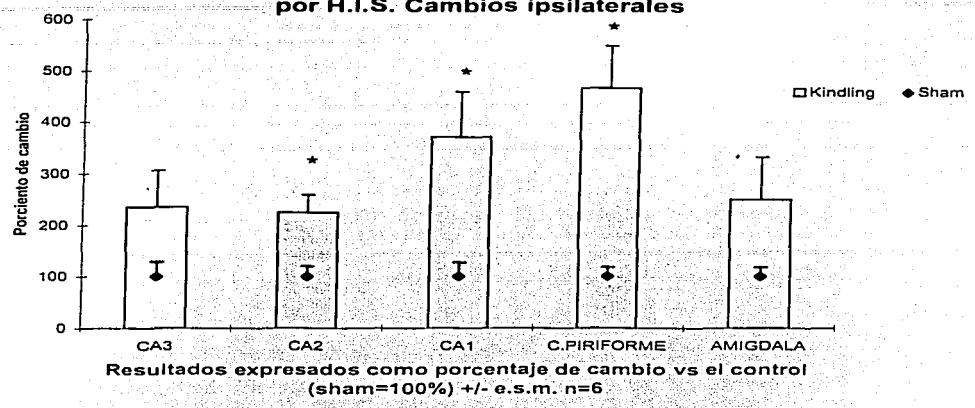


experimental

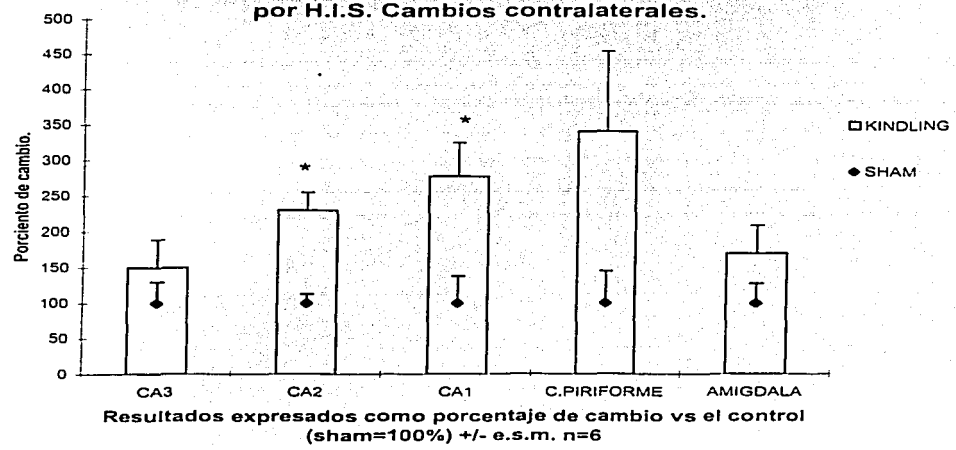


sham

**Gráfica 7. Contenido de RNAm de PPII en el Kindling etapa II por H.I.S. Cambios ipsilaterales**



**Gráfica 8. Contenido de RNAm de PPII en el Kindling etapa II por H.I.S. Cambios contralaterales.**



síntesis del péptido en esta región, si existe TRH inmunorreactivo, con probables acciones como modulador de la acción de acetilcolina y/o glutamato.

**-PPII en cerebros de animales sacrificados 24 horas después de alcanzar la etapa II del Kindling amigdalino.**

Los cerebros de un grupo de animales que alcanzaron la etapa II y sacrificados 24 horas después se rebanaron produciendo cortes transversales y se hibridaron con los oligonucleótidos de la PPII. El film se expuso durante 3 semanas y se analizó. Estos tejidos no se emulsionaron.

Se encontró sólo un aumento significativo tanto ipsi ( $109 \pm 0.7\%$ ) como contralateralmente ( $106 \pm 1.3\%$ ) al sitio de la estimulación en la corteza frontal. El aumento es pequeño comparado con el obtenido por Northern a la misma hora de sacrificio (143%) (Gráficas 9, 10). La relación no parece ser tan buena como la de hibridación *in situ* vs RT-PCR, pero esto tal vez es debido a que el análisis fue verificado con el film que es menos sensible que la autorradiografía por emulsión de los tejidos de 6 h.

No se encontraron cambios en el hipocampo ni en la amígdala, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Northern blot a las 24 horas de alcanzar la etapa II. (Gráfica 3 y 4)

En las Gráficas 11 a 16 se muestran la cinética de los cambios en el contenido de RNAm de TRH y PPII sobre las modificaciones en la actividad de la enzima y en el contenido de TRH a lo largo del kindling.

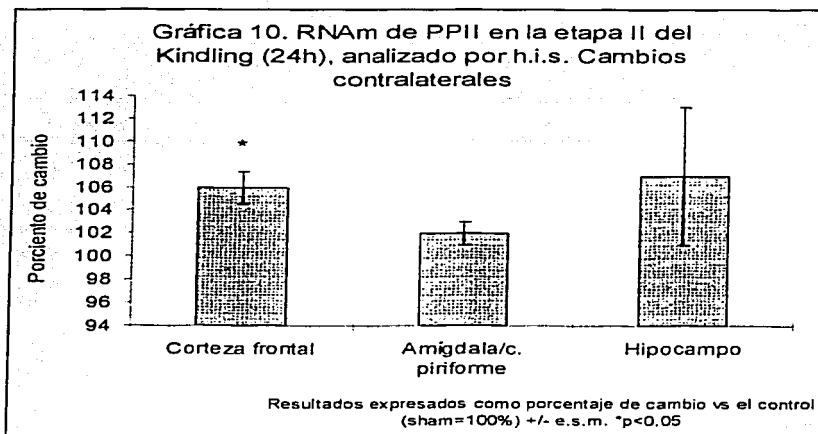
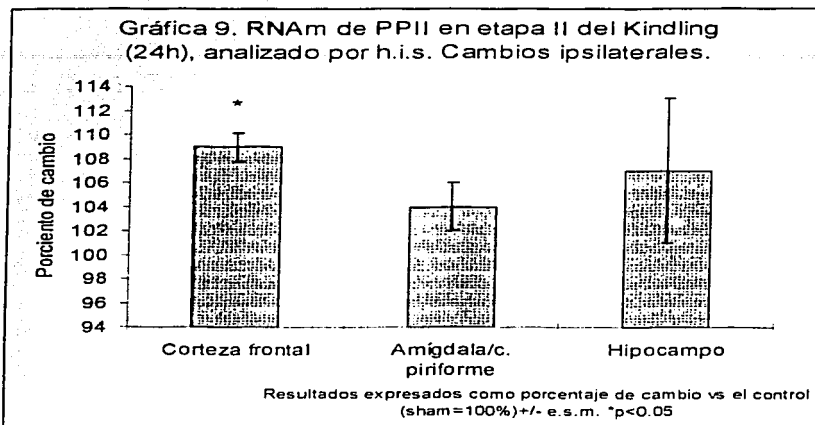
**Modelo de etanol.**

Aproximadamente unos 5-10 minutos después de la inyección i.p. de etanol todos los animales quedaron sedados por el efecto del narcótico y comenzaron a despertar  $90 \pm 15$  min. Los animales inyectados con la solución salina, no presentaron ningún cambio de comportamiento.

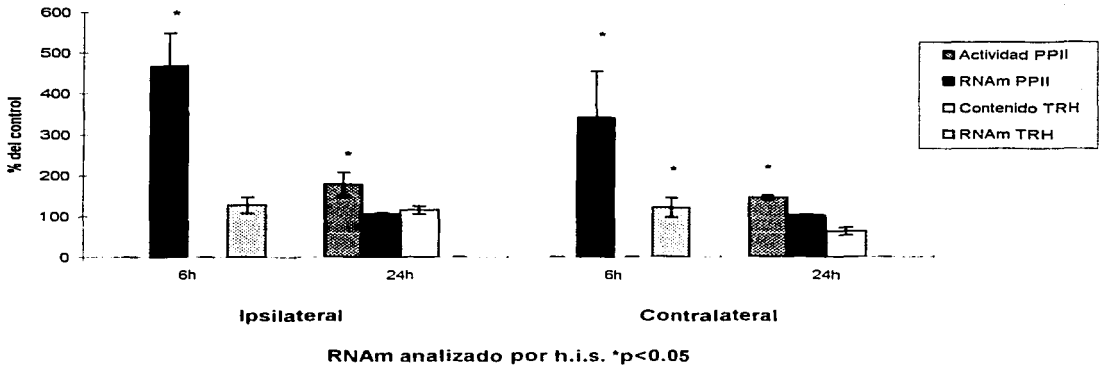
**Contenido de TRH y Actividad de la enzima PPII.**

Las modificaciones en el metabolismo de TRH en el SNC después de la inyección i.p. de etanol se evaluó midiendo la concentración de TRH por RIA y la actividad de la enzima PPII, así como el contenido de RNAm del péptido y su enzima degradativa. Para los primeros dos eventos se analizaron los cerebros de las ratas sacrificadas 1h, 6h y 24 horas después de la inyección. Se analizó la porción izquierda de cada zona del cerebro para TRH y la derecha para la actividad de la enzima.

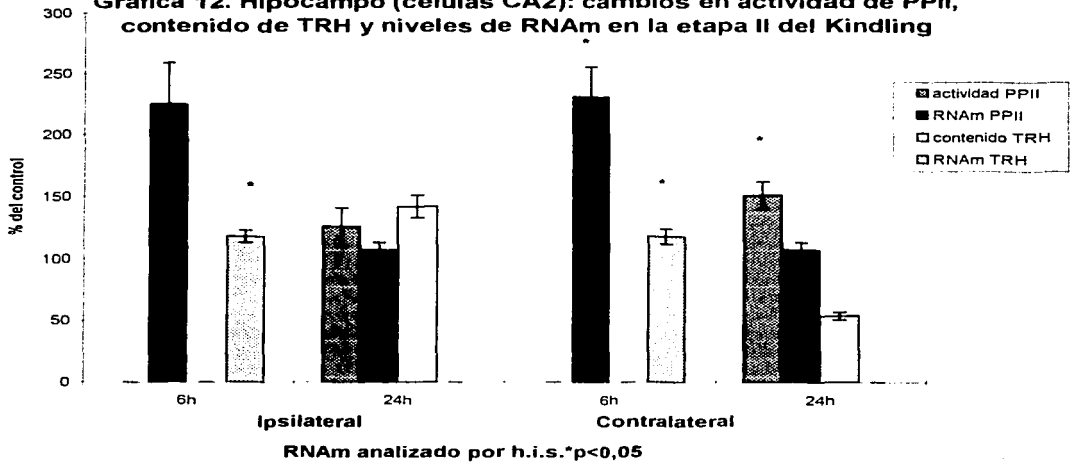




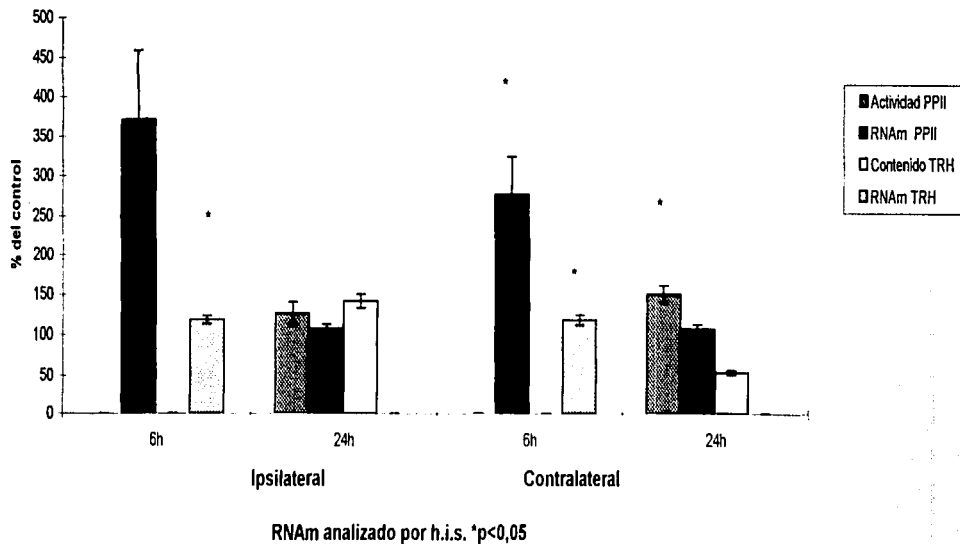
**Gráfica 11. Amígdala/c. piriforme: Cambios en actividad de PPII, contenido de TRH y niveles de RNAm en la etapa II del Kindling**



**Gráfica 12. Hipocampo (células CA2): cambios en actividad de PPII, contenido de TRH y niveles de RNAm en la etapa II del Kindling**

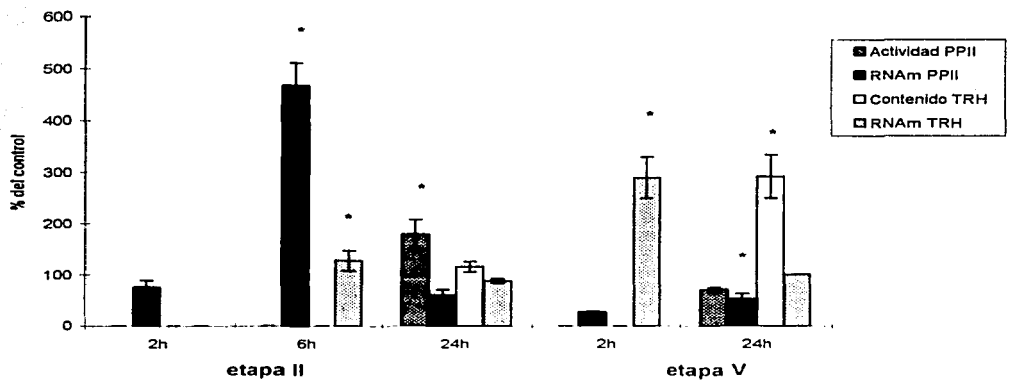


Gráfica 13. Hipocampo (células CA1): cambios en actividad de PPII, contenido de TRH y niveles de RNAm en la etapa II del Kindling

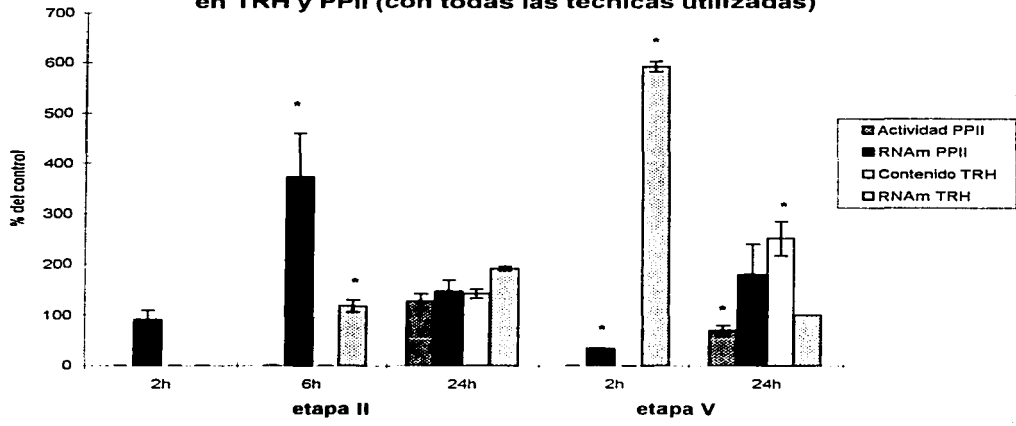


TRH  
FALLA

**Gráfica 14. Amígdala/c. piriforme ipsilateral. Cinética de cambios durante el kindling en TRH y PPII (con todas las técnicas utilizadas).**



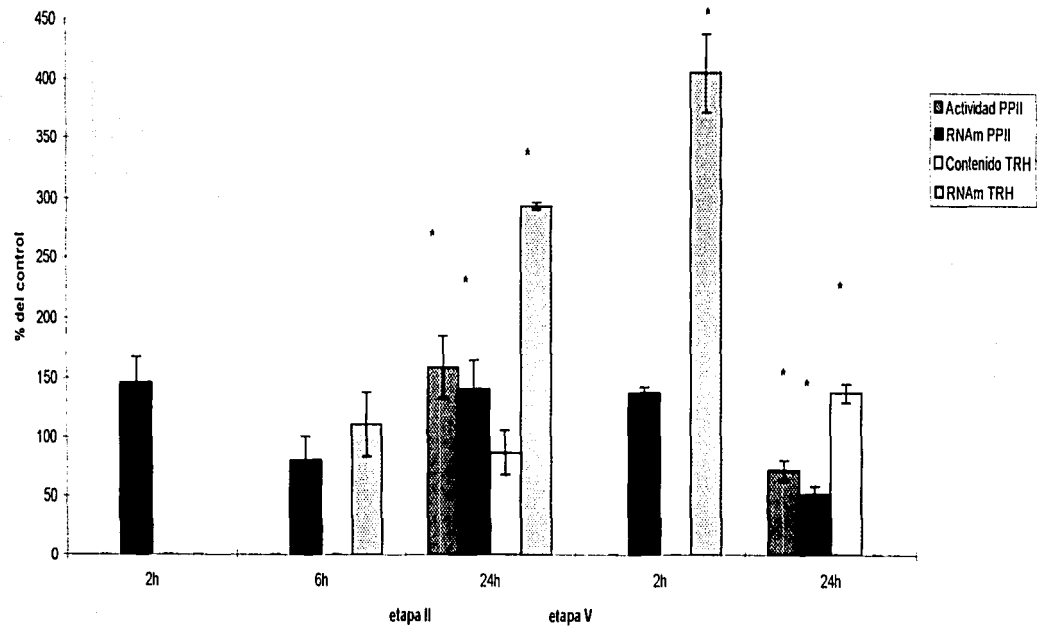
**Gráfica 15. Hipocampo. Cinética de cambios durante el Kindling en TRH y PPII (con todas las técnicas utilizadas)**



-51a-



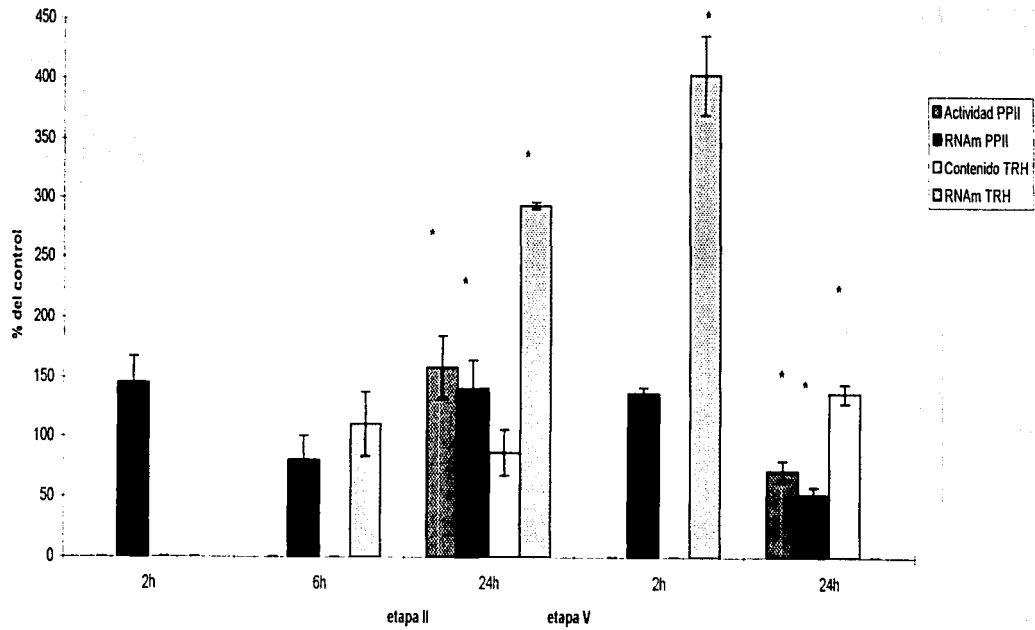
Gráfica 16. Corteza frontal contralateral. Cinética de cambios durante el kindling en TRH y PPII (con todas las técnicas utilizadas)



- Ste -

TESIS DE GRADUACION  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Gráfica 16. Corteza frontal contralateral. Cinética de cambios durante el kindling en TRH y PPII (con todas las técnicas utilizadas)



Todas las regiones cerebrales estudiadas mostraron cambios en el contenido de TRH y en la actividad de la enzima después de una sólo inyección i.p. de etanol.

El **núcleo accumbens** mostró los cambios más rápidos. El TRH en esta región participa en la actividad motora de los animales (*Miyamoto 1977, Yamamura 1991*) ya que interacciona con las vías dopaminérgicas a través de los receptores D2. La actividad de la PPII disminuyó en el grupo sacrificado a las 6h postinyección mientras que en el de 24 horas se encontró aumentada significativamente al comparar contra los controles (**Gráfica 17**).

El contenido de TRH en el **hipocampo** también mostró cambios rápidos (1 hora después de la inyección de etanol), pero se observó un aumento del 60% al comparar contra los valores control que representan el 100% y a las 24 horas se normalizaron. La actividad de la PPII disminuye en el grupo sacrificado 6 horas postinyección mientras que a las 24 horas el efecto ya no se observa (**Gráfica 18**).

**La amígdala, el hipotálamo y la corteza frontal** también mostraron disminución en la concentración de TRH pero más tarde que la observada en el n. accumbens y el hipocampo. Es hasta las 6h p.i que se observa una diferencia significativa al comparar contra los valores del grupo control.

La corteza frontal y la amígdala mostraron cambios en la actividad de la PPII en el grupo de animales sacrificados a la hora, sin manifestar modificaciones previas en el contenido de TRH (**Gráficas 19,20**).

Los cambios más tardíos se observaron en el **hipotálamo**, con una disminución en el contenido de TRH 6 horas p.i. y una elevación en la actividad de la enzima PPII en el grupo de 24 horas (**Gráfica 21**).

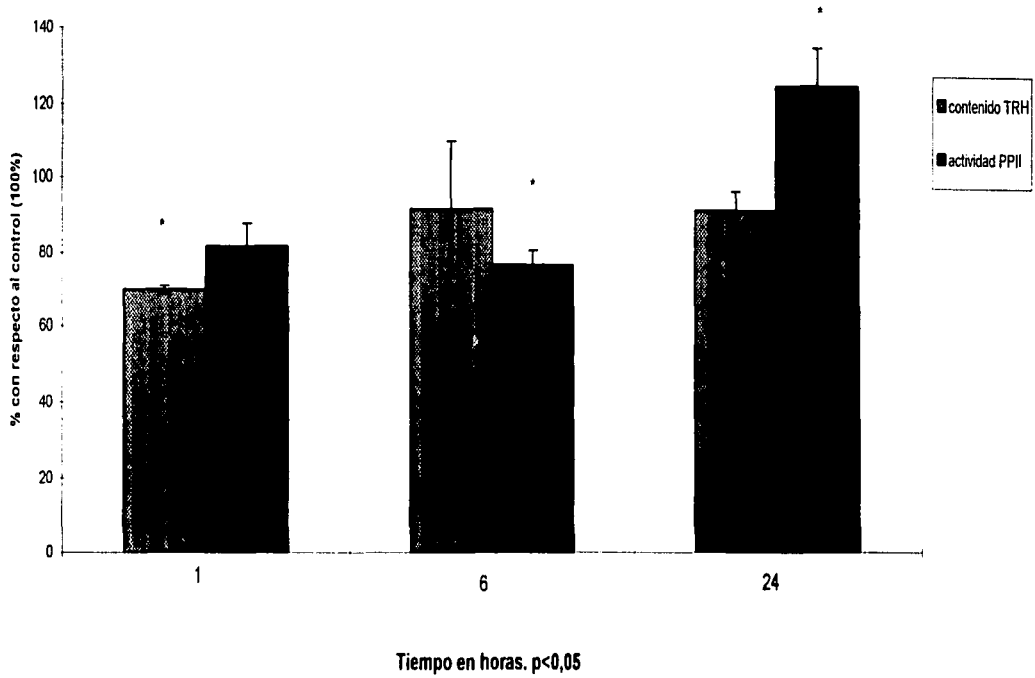
La actividad de la enzima decreció 1 hora después de la inyección de etanol en la corteza frontal y 6 horas después en el n. accumbens para luego aumentar a las 24 horas en ambas regiones. Este comportamiento bifásico en la actividad de la enzima que degrada al TRH en las mismas regiones cerebrales, después de estimular eléctricamente a los animales (kindling amigdalino, *de Gortari 95*).

#### **Cambios dependientes del tiempo en el metabolismo de TRH.**

En el hipotálamo y la corteza frontal, el contenido de TRH aumentó gradualmente desde las 6 horas (-22% hasta 150%) hasta las 24 h p.i. La actividad de la PPII mostró también una elevación dependiente del tiempo de sacrificio de los animales, en las mismas regiones cerebrales (-60% hasta valores normales).

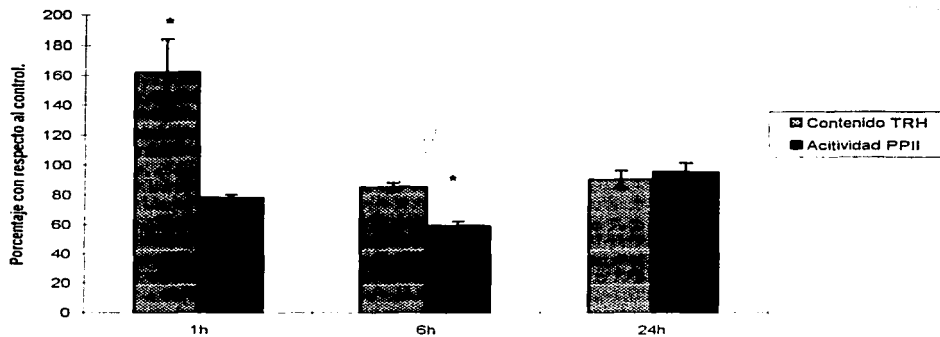
TRH  
ACTIVIDAD PPII

Figura 17. Núcleo accumbens: contenido de TRH y actividad de PPII después de la inyección i.p. de etanol



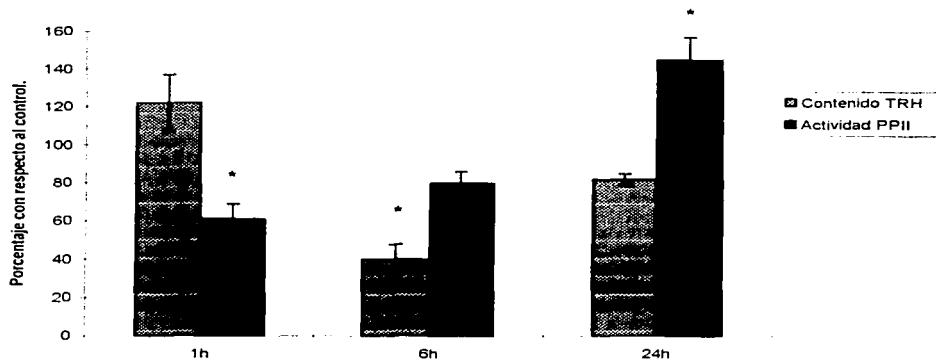


**Gráfica 18. Hipocampo: contenido de TRH y actividad de PPII después de la inyección i.p. de etanol**



Resultados expresados como la media de los cambios en porcentaje vs el control (100%) +/- e.s.m. \*p<0.05

**Gráfica 19. Corteza frontal: contenido de TRH y actividad de PPII después de la inyección i.p. de etanol.**

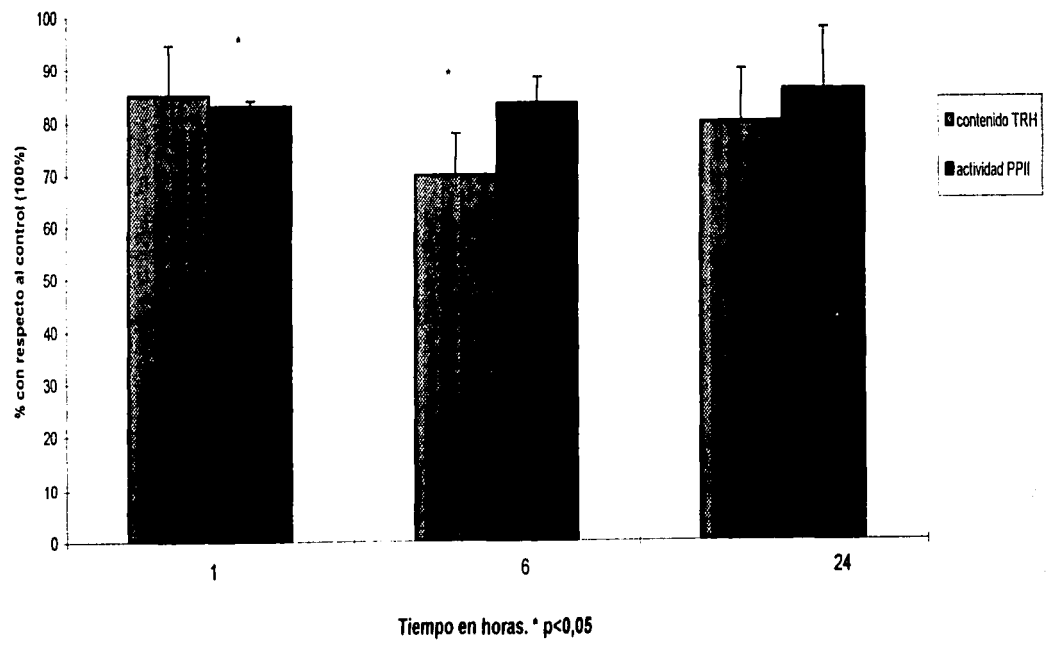


Resultados expresados como la media de los cambios en porcentaje vs el control (100%) +/- e.s.m. \*p<0.05

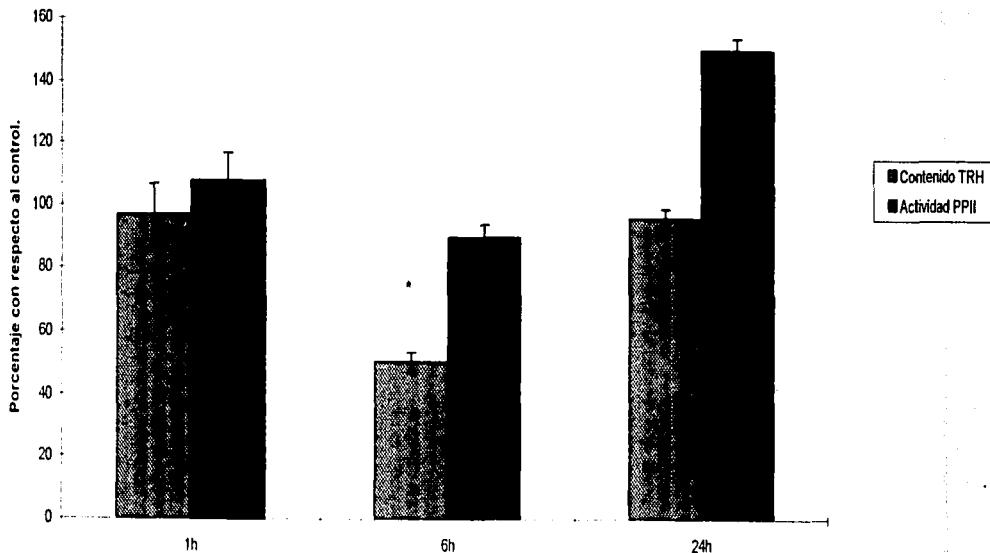
-526-

UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

Figura 20. Amígdala: contenido de TRH y actividad de PPII después de la inyección i.p. de etanol.



**Gráfica 21. Hipotálamo: contenido de TRH y actividad de PPII después de una inyección i.p. de etanol.**



Resultados expresados como la media de los cambios en porcentaje vs el control (100%) +/- e.s.m. \*p<0,05

TESIS  
FALLA DE...  
...

El hipocampo presentó un comportamiento opuesto, ya que se observaron disminuciones significativas en el contenido de TRH comparando con los valores más elevados que aparecieron una hora p.i. (+160% hasta valores normales).

La concentración de TRH en el n. accumbens no mostró un cambio significativo con el tiempo, pero la actividad de la PPII sí se incrementó a partir de las 6 horas p.i. de -25%, hasta alcanzar valores de 125% a las 24 horas.

La amígdala no tuvo modificaciones en el contenido de TRH ni en la actividad de la PPII con respecto al tiempo.

#### **Concentración de TSH:**

Después de la administración de la inyección intraperitoneal de etanol, los valores séricos de TSH disminuyeron a casi tres veces los valores normales en el grupo de animales de 1 hora y se normalizaron en el grupo de 6 horas (**Gráfica 22**).

#### **Contenido de RNAm de TRH y PPII.**

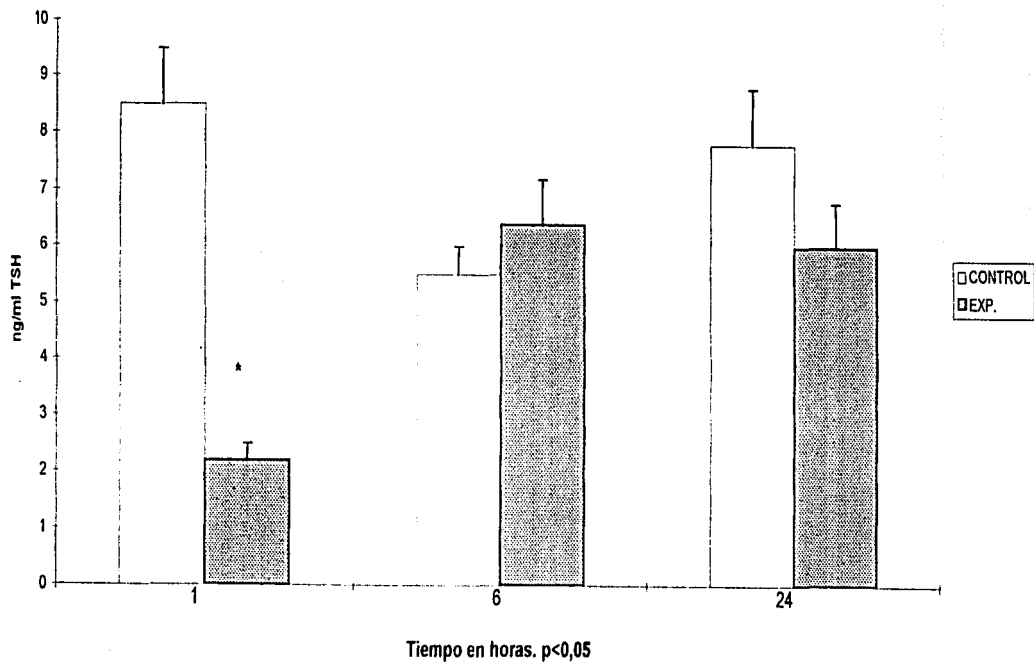
Para analizar los cambios en la síntesis de TRH y de la PPII se obtuvieron los cerebros de grupos de animales sacrificados 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 16 h, 20 h y 24 horas después de la inyección i.p. de etanol y sólo en las regiones de hipotálamo sin área preóptica, hipocampo y corteza frontal, con objeto de observar cambios previos y posteriores en el contenido de RNAm de TRH y PPII (analizado por RT-PCR) con respecto a las modificaciones observadas en la concentración del péptido y en la actividad de la enzima.

**En la corteza frontal.** Se analizaron los cerebros obtenidos a los 30 min, 2h, 4 h, y 6 h, y encontramos una disminución en el contenido de RNAm de la PPII del 62% a los 30 min, a las 2h, los niveles se reestablecieron y a las 4 h p.i. aumentaron significativamente en un 328.7% al comparar contra los valores de los animales control, para ir disminuyendo a partir de las 6 horas. (**Gráfica 23**).

El contenido de RNAm de TRH disminuyó en esta región del cerebro a 1 hora un 23%.

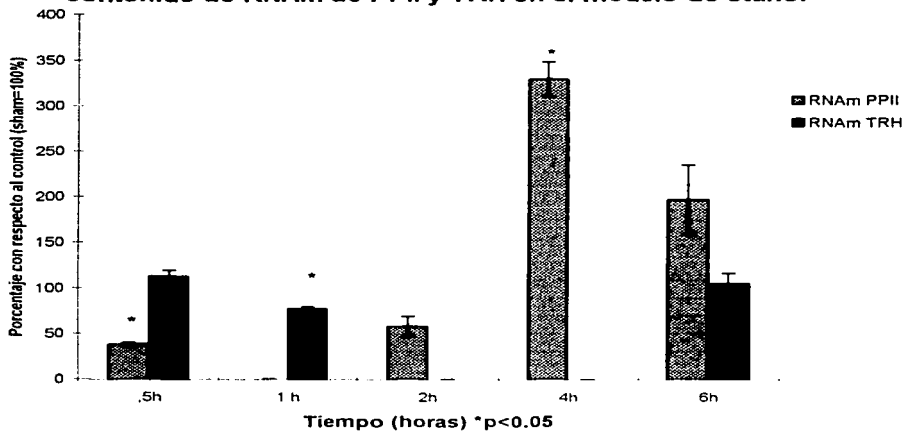
**En el hipotálamo.** Los niveles de RNAm de TRH mostraron un aumento significativo con respecto a los valores de los animales control desde 1 hora después de la inyección de etanol de 244% y todavía un aumento posterior de 401.4% a las 20 horas aunque a las 16 horas encontramos valores parecidos a los control. En cambio los niveles de RNAm de PPII se encontraron normales a las 4 horas, a las 6 horas disminuyeron a un 58.6% pero la diferencia no es significativa, para aumentar a las 16 horas en un 400.16% ( $p < 0.05$ ) (**Gráfica 24**).

Figura 22. Concentración de TSH sérica después de la inyección i.p. de etanol.

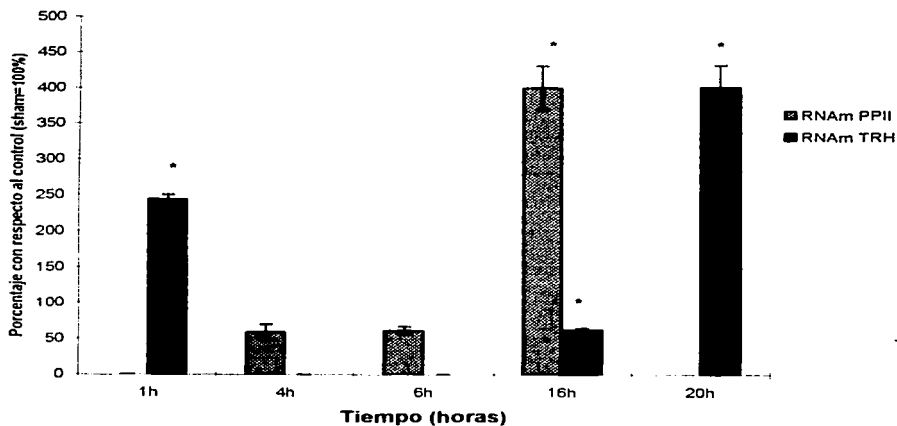


TESIS CON  
FALLA DE CUBRIM

**Grafica 23. Corteza frontal: cinética de cambios en el contenido de RNAm de PPII y TRH en el modelo de etanol**



**Gráfica 24. Hipotálamo: cinética de cambios en el contenido de RNAm de TRH y PPII en el modelo de etanol.**



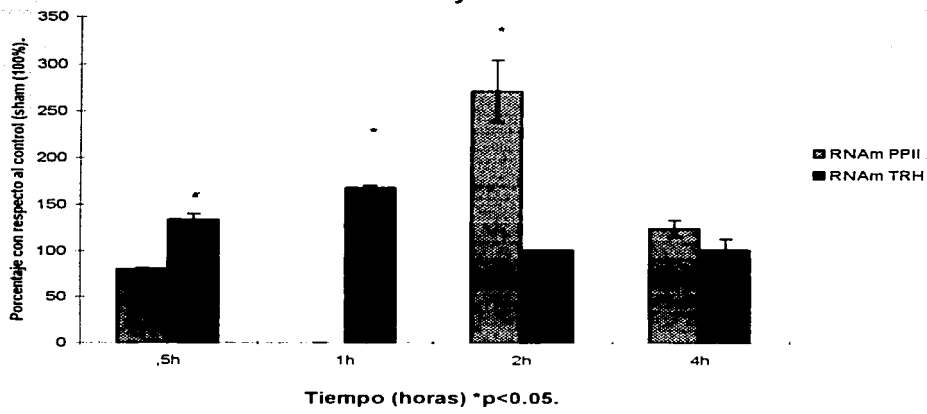
**En el hipocampo.** Los animales sacrificados 30 minutos después del tratamiento, mostraron niveles significativamente elevados de RNAm de TRH (133%) analizado por PCR, y se mantuvieron elevados por 167% a la hora post inyección.

El RNAm de la PPII en cambio, no presentó modificación en su concentración a los 30 minutos después de la inyección, a las 2 horas se presentó un aumento significativo de 271% para regresar a valores normales a las 4 horas p.i. (**Gráfica 25**).

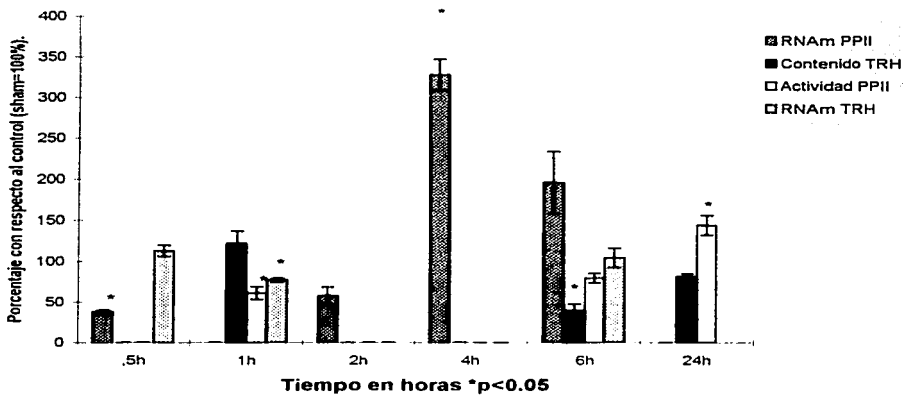
Las **Gráficas 26, 27, 28** muestran la cinética de cambios en el contenido de RNAm de PPII y TRH sobre las modificaciones en actividad de la enzima y en el contenido de TRH por RIA, donde pueden apreciarse cambios en los niveles de RNAm previos a los cambios en actividad de la enzima.

TESTES COM  
FALLA EN EL MANEJO

**Gráfica 25. Hipocampo: cinética de cambios en el contenido de RNAm de PII y TRH en el modelo de etanol.**

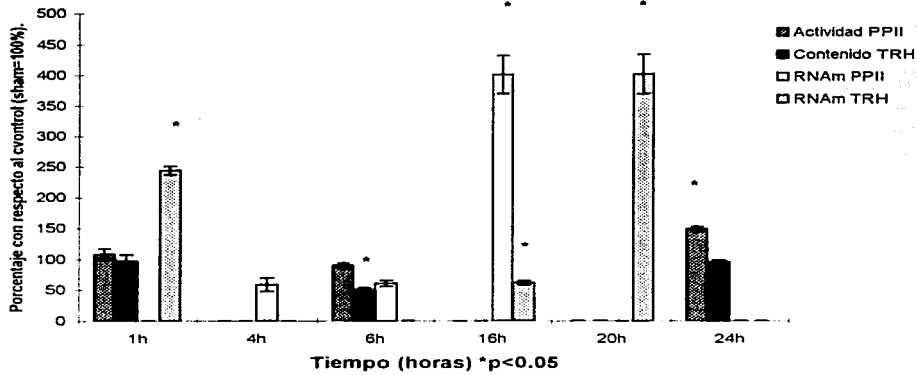


**Gráfica 26. Corteza Frontal: cambios de TRH y PII después de la inyección i.p. de etanol.**

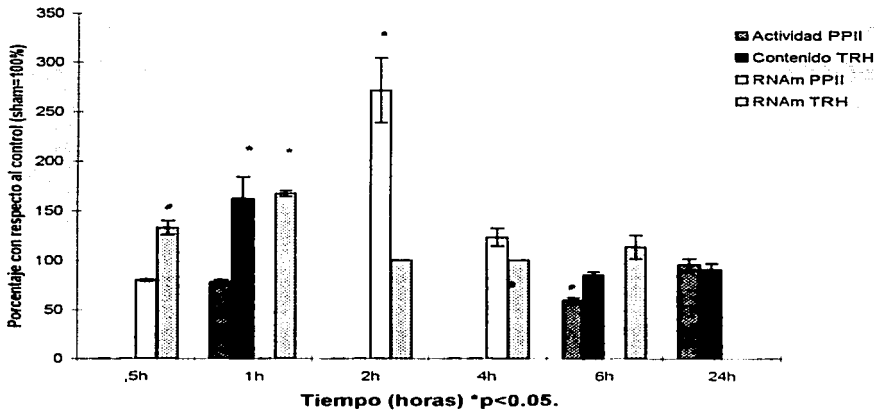




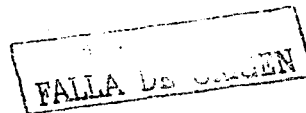
**Gráfica 27. Hipotálamo: cambios en TRH y PPII después de la inyección i.p. de etanol**



**Gráfica 28. Hipocampo: cambios en TRH y PPII después de la inyección i.p. de etanol.**



## VI. DISCUSION.



### Modelo del kindling amigdalino.

El kindling amigdalino activa la vía TRHérgica de las regiones cerebrales epileptogénicas, como amígdala, hipocampo, corteza frontal, n. accumbens y también del hipotálamo, modificando el contenido de TRH, su liberación, su síntesis, así como la actividad y los niveles de RNA mensajero de su enzima degradativa, la PPII, esto último sólo en amígdala, corteza frontal e hipocampo.

El aumento en la expresión del gen de TRH se observó por RT-PCR desde las dos horas de alcanzar la etapa V en la amígdala/corteza piriforme y en el hipocampo. Por hibridización *in situ* los aumentos pudieron detectarse en los animales sacrificados a las 6 horas después de alcanzar la etapa II, con mayor intensidad en las regiones ipsilaterales de la corteza piriforme, frontal, amígdala, hipotálamo e hipocamp. En las regiones contralaterales los cambios significativos sólo aparecieron en el hipocampo y el hipotálamo. Esto concuerda con lo observado por *Rosen et al*, quien midió el contenido de RNAm de TRH en la etapa I, en la corteza entorhinal y piriforme y en el giro dentado (*Rosen 1992*) por hibridización *in situ*. Los niveles de RNAm de TRH aparecen *de novo* en estas regiones; son transitorios, ya que en animales sacrificados dos semanas después de las crisis generalizadas, son comparables a los de los animales sham. Los cambios que nosotros encontramos a las 6 horas de alcanzar la etapa II no son mayores del 30% en ninguna de las regiones estudiadas. Sin embargo, los incrementos son consistentes y significativos.

*Rosen et al*, (1993) encontró que la elevación en los niveles de RNAm de TRH en el giro dentado tiene una correlación positiva con la duración de las postdescargas, de la misma manera que el RNAm de *c-fos* en la etapa I del kindling. *C-fos*, es un proto-oncogene localizado en neuronas que se transcribe entre 15 y 30 minutos después de un estímulo como la aparición de las convulsiones, y se ha utilizado como marcador de la activación neuronal (*Dragunow 1989*). Las regiones cerebrales que presentan altraciones en los niveles de RNAm de TRH durante el progreso del kindling corresponden a las áreas donde *Dragunow et al* (1989) ha encontrado que el RNAm de *c-fos* incrementa con las convulsiones.

Entre las bases moleculares del fenómeno del kindling se encuentran los cambios en la expresión de genes y el aumento de *c-fos* [como consecuencia de la estimulación eléctrica (*Labiner 1993*) y química (con inyecciones de PTZ) (*Erdtman 1998*)] se ha observado en el hipocampo (*Dragunow 1987*) y en la corteza entorhinal, piriforme y perirhinal (*Rosen 1993*) por hibridización *in situ*. Además, 5 horas después de la tercera convulsión de la etapa V del kindling, existe colocalización de inmunorreactividad de Fos y expresión de TRH en la

corteza entorhinal, piriforme, perirhinal y en el giro dentado del hipocampo (Rosen 1993). Estas son las principales células eferentes que proyectan desde dichas estructuras. La corteza piriforme tiene la mayoría de las proyecciones hacia áreas como el bulbo olfatorio, la amígdala y las cortezas entorhinal y perirhinal. La perirhinal proyecta hacia las cortezas piriforme y entorhinal y la amígdala. La corteza entorhinal es la principal zona de entrada hacia el giro dentado y éste proyecta hacia la región CA3 del hipocampo. Así se forma un circuito continuo de interrelación entre las áreas límbicas donde se encuentra colocalizada la expresión aumentada de Fos y TRH por kindling amigdalino. Cada una de estas regiones juega un papel diferente en la aparición de las convulsiones. Las cortezas piriforme y entorhinal se han propuesto como generadores epileptogénicos. La corteza perirhinal principalmente actúa propagando la actividad epileptiforme hacia otras áreas límbicas. El giro dentado regula la dispersión de las convulsiones desde la entorhinal hacia el propio hipocampo promoviendo la amplificación de la actividad convulsivante (Rosen 1993). Nosotros encontramos en estas zonas (de Gortari et al 1998) una correlación positiva ( $r > 0.65$ ) y significativa ( $p < 0.05$ ) entre la frecuencia de las postdescargas de animales estimulados eléctricamente en la región de la amígdala, con los cambios en el contenido de TRH durante el progreso del kindling. Este análisis definió a la corteza frontal ipsilateral como la región más responsiva en cuanto al contenido de TRH con respecto al aumento en frecuencia y duración de la PD, seguida de la amígdala ipsi y contralateral y > que el n. accumbens ipsilateral. Los valores de la pendiente de la regresión lineal variaron dependiendo de la región analizada, siendo los más altos los de la corteza frontal ipsilateral ( $m=6.7$ ), seguida de la amígdala ipsilateral ( $m=3.7$ ) cuando la regresión se realizó hasta la etapa V y de 2.7 hasta la IV, y los más bajos en el n. accumbens ( $m=1.6$  contralateral y  $m=1.3$  ipsilateral). La tasa de cambios en la concentración de TRH en relación a la frecuencia y duración de las PD sugiere diferencias en la respuesta bioquímica entre las zonas límbicas y otras regiones del SNC. Además, concuerdan con los resultados de Rosen 1993 en cuanto a la mayor sensibilidad que muestra la corteza cerebral en la presentación de aumentos en la inmunorreactividad de Fos colocalizados con la expresión de TRH, y en el sentido de que la propagación de las PD inducen cambios en el contenido de TRH en amígdala e hipocampo.

La expresión aumentada de TRH desde la etapa I y detectada por nosotros en la II puede explicarse por su colocalización con *c-fos*. Después de la estimulación, los niveles más altos de la proteína Fos se presentan de 1-4 horas después de las convulsiones, y la expresión de TRH aparece hasta 1 hora después de la estimulación con el pico de incremento entre 6 y 12 horas después, quedando presente hasta las 24 horas post-crisis, lo que sugiere que Fos puede actuar como factor de transcripción para TRH en el giro dentado y en la corteza de la zona límbica con el kindling amigdalino (Rosen 1992). La inducción de la expresión de TRH puede ser causada por *c-fos*, ya que el dímero que forma con *c-jun* (AP-1) tiene un sitio de reconocimiento en la región

promotora del gen (Lee 1998). La magnitud de la inducción de *c-fos* está relacionada a la aparición de las postdescargas (Chiasson 1995) y con la etapa alcanzada (Erdtman 1998), de la misma manera que el aumento en el contenido del péptido desde la etapa II tiene una correlación con la frecuencia y duración de las PD en la corteza frontal, amígdala e hipocampo (de Gortari 1998), lo que puede ser reflejo de la inducción de síntesis del TRH observada en la misma etapa en este estudio y por otros autores (Rosen 1992).

En la amígdala la expresión de *c-fos* está asociada con los mecanismos cerebrales que llevan a retardar el desarrollo del kindling, porque su inhibición utilizando oligodesoxinucleótido en antisentido vs *c-fos* acelera el desarrollo de las convulsiones de la etapa V del kindling (Chiasson 1998, Rocha 1998). De modo que que el efecto que tiene sobre el TRH apoyaría la participación del péptido en uno de los mecanismos compensatorios que disparan las mismas convulsiones.

También existen estudios que, implican a *c-fos* con los cambios en la plasticidad funcional y estructural del hipocampo, tal como la proliferación de las fibras musgosas inducida por el kindling. Esto se ha probado en ratones transgénicos con una mutación total (null) de *c-fos* (Watanabe 1996).

La expresión de neurotrofinas (BDNF, NGF) y sus receptores *trkB* y *trkC* es inducida 2 h después de una sola estimulación de kindling (Ernfors 1991) en el giro dentado del hipocampo. Estos factores y sus receptores participan en la formación de las conexiones aberrantes y circuitos recurrentes característicos del establecimiento del kindling hipocampal (Bengzon 1993, Kang 1996). El BDNF aumenta los niveles de RNAm de TRH de 2 a 3 veces durante las primeras etapas de desarrollo de neuronas *in vitro* y en respuesta a estrés por inmovilización el BDNF se coexpresa en células TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo. Además, por doble hibridación *in situ*, se ha detectado el RNAm de BDNF (*trkB*) en neuronas maduras del PVN (Joseph-Bravo 1998). La distribución del RNAm del BDNF es amplia y se ha identificado en la amígdala, corteza cerebral, piriforme y giro dentado, donde también se expresa TRH durante el kindling. Queda por definirse si el BDNF afecta la expresión de TRH en zonas límbicas como resultado de la actividad eléctrica para contrarrestar la actividad neuronal incrementada o bien, para activar la proliferación de las fibras musgosas y de los cambios en conectividad celular asociados con el kindling.

Además del efecto que el BDNF puede tener sobre la expresión de TRH durante el progreso del kindling, también existe la posibilidad de que el TRH modificando la actividad de los receptores a NMDA (Renaud 1979, Nistri 1990, Rekling 1992, Koenig 1996), interfiera con la acción de la neurotrofina, ya que la inyección de un bloqueador de los receptores a NMDA (MK.801), que

FALLA DE ORIGEN

retarda el desarrollo del kindling, induce una disminución de la expresión de BDNF, de *trkB*, *c-fos* y no de *trkC* (Hughes 1998).

Dada la inexistencia de un antagonista de TRH, algunas estrategias que se podría utilizar para definir la participación del péptido en la epileptogénesis, son el bloqueo de su síntesis utilizando oligonucleótidos en antisentido, previamente probada para observar la regulación del péptido en la motilidad gástrica (Sivarao 1997); o bien, la inyección i.c.v. de anticuerpos anti TRH para inhibir el efecto del péptido, tal como se ha hecho para somatostatina (Monno 1993); o bien, después de bloquear la expresión de *c-fos* en ratas estimuladas por kindling, las que presentan una aceleración del mismo (Chiasson 1998, Rocha 1998), medir los cambios en el metabolismo de TRH.

Puesto que otros sistemas de neurotransmisores y neuropéptidos [el factor de liberación de la corticotropina (CRF), somatostatina (SRIF), opioides, DA, NE, etc.] se activa durante el progreso del kindling, que se sabe están relacionados con la expresión de TRH, los cambios encontrados en este estudio reflejan la respuesta integrada a todos estos estímulos de las neuronas TRHérgicas. Ej. la naloxona (10mg/Kgi.p.), un antagonista de los receptores a opioides, inyectada 30 min antes de aplicaciones de PTZ durante el kindling, inhibe el aumento de *c-fos* inducido por el anticonvulsivante (Erdtman 1998); el kindling (crisis generalizadas) y los choques electroconvulsivos (3 consecutivos) aumentan los niveles de RNAm de CRF en el giro dentado al comparar contra los valores de los animales sham (Smith 1991). Además los animales con una producción deficiente de CRF (Lewis) y por lo tanto con una inadecuada respuesta al estrés necesitan más estimulaciones para alcanzar la etapa V del kindling (Weiss 1993). Este péptido puede afectar también la expresión de TRH (Kacucska 1995).

La síntesis de TRH aumentada desde la etapa II es responsable de la recuperación de los niveles en el contenido del péptido que se observa en el n. accumbens y en el hipotálamo, donde disminuyen desde la etapa II y van incrementando hasta alcanzar los valores de los animales control en la etapa V (de Gortari 1995). El aumento en la actividad de la enzima durante el kindling, desde la etapa II, y la inhibición de un 30% después de la aparición de las convulsiones generalizadas, principalmente en la amígdala, corteza frontal y el hipocampo (de Gortari 1995), parecen ser el reflejo de una regulación de la síntesis de la enzima en ambos estadios, ya que existe un aumento en la síntesis desde las 6 horas después de alcanzar la etapa II en la amígdala y en el hipocampo (identificado por RT-PCR y corroborado por HIS), aunque sólo después de 24 horas en la corteza frontal (por Northern) (Gráfica 2), y una disminución en los niveles de RNAm de PPII a las 24 horas después de la etapa V en la amígdala, hipocampo y corteza frontal. Puesto que la liberación de TRH durante el kindling se ha observado en rebanadas de hipocampo de animales que presentaron convulsiones generalizadas sometidas a una alta

FALLA DE IMPRESIÓN

concentración de potasio, dependiente de calcio (*Knoblach 1997*), es factible suponer que al menos algunos de los cambios en la síntesis de la PPII pueden ser provocados por el TRH.

Existen evidencias indirectas de que la PPII es una enzima postsináptica, ya que la degeneración de las neuronas TRHérgicas después de la inyección de la droga 5, 7 dihidroxitriptamina provoca disminución del contenido de TRH y no de la actividad de la enzima, además de que en la región lumbar apareció un incremento en actividad después de 6 a 8 semanas (*Joseph-Bravo 1994*), tal como sucede para los receptores de TRH en la médula espinal con este modelo (*Sharif 1983*). No existe una correlación clara entre la distribución de la actividad y el RNAm de la PPII y los receptores de TRH (*Lin 1998, Heuer 1998*), pero las regiones que tienen alta concentración de los receptores a TRH también tienen alta actividad de la PPII y su desarrollo ontogenético coincide con la sinaptogénesis (*Vargas 1992b*).

Por otro lado, uno de los cambios moleculares que se le atribuyen al TRH en el SNC es la modificación de la actividad de los receptores a NMDA (*Renaud 1979, Rekling 1992, Koenig 1996*) altera la conductancia de iones de potasio e induce despolarización de la membrana, activando a la neurona postsináptica. El mecanismo propuesto para que el TRH induzca estos cambios es a través de su receptor (*Stocca 1995*) y no tanto por un efecto directo sobre la resistencia de la membrana plasmática. En ovocitos de *Xenopus* que coexpresan canales de  $K^+$  y receptor de TRH, el péptido induce una desactivación dependiente de voltaje de los canales de  $K^+$ . Sus efectos son imitados por una activación farmacológica de la PKC con  $\beta$ -forbol-12-miristato, 13 acetato (PMA), y antagonizados por un inhibidor específico de la PKC que también bloquea la regulación de los canales de  $K^+$  dependiente de PKA (*Barros 1998*). Así el TRH afectaría la transmisión sináptica durante el kindling, pero además con la activación de la PKC, los canales de calcio de los receptores a NMDA se abrirían permitiendo un influjo de este ion (*Stocca 1995*) que activaría la transcripción de genes como el de la enzima PPII. La activación diferencial de las subespecies de la PKC en el cerebro de rata durante el kindling hipocampal (*Ono 1994*) podría ser necesaria para la regulación de la actividad de la enzima.

El efecto de TRH sobre la actividad de la PPII en adenohipófisis es una inhibición que es imitada por la activación de la PKC utilizando ésteres de forbol. Los efectos de las dosis máximas del TRH y de los ésteres de forbol no son aditivos, lo que sugiere un mecanismo de acción común (*Vargas 1994*). Tomando en cuenta los tiempos para observar el efecto de TRH sobre la actividad de la PPII en células de adenohipófisis en cultivo (16 horas) la regulación parece ser a nivel de síntesis, ya que midiendo el nivel de RNAm de la PPII, éste disminuye previamente a la inhibición en actividad de la enzima

en respuesta a TRH (Vargas 1998, Joseph-Bravo 1998). En células hipotalámicas o corticales en cultivo, no ha podido observarse el efecto de TRH.

Nuestros resultados en cambio, muestran una regulación bimodal de los niveles de RNAm de la enzima. Un aumento en la etapa II y una inhibición en la etapa V, que además concuerda con los resultados previos en actividad en respuesta al kindling amigdalino. El TRH también produce una respuesta bifásica, involucrando diferentes proteínas G, en células de hipófisis de rata (Bauer CK 1994). Una liberación inicial del  $Ca^{2+}$  almacenado, induce una hiperpolarización de la célula, y después una despolarización inducida por la reducción ya caracterizada de la corriente de entrada de  $K^+$  provoca al mismo tiempo un aumento en la frecuencia del potencial de acción y un *plateau* en el incremento de  $Ca^{2+}$ . Se ha propuesto que las dos fases sean inducidas por las acciones del inositol 1,4,5 trifosfato ( $IP_3$ ) y por la PKC, respectivamente. Sin embargo, también es posible que la divergencia sea a nivel de las proteínas G (Bauer CK 1994) lo que explicaría las diferencias en respuesta de las células dependiendo de la región cerebral en estudio y los cambios bimodales en la transcripción de la enzima.

Se han identificado sitios probables de fosforilación de la enzima (Schauder 1994), sin embargo aquí se muestra que al menos uno de los eventos regulables de la actividad de la PPII es su síntesis, sin descartarse cambios en su conformación, los que tendrían efecto a tiempos más cortos, y que serán detectables en el momento en que se cuente con anticuerpos contra la enzima.

Puesto que el kindling amigdalino activa otros sistemas de neurotransmisores, como glutamato, GABA, NE, DA, segundos mensajeros CREB (Deiseroth 1996), factores de transcripción como *c-fos* (Labiner 1993), factores tróficos (BDNF), estos no pueden descartarse como efectores de la regulación de la transcripción de la enzima.

El contenido de RNAm de la PPII analizado por hibridización *in situ*, se encuentra específicamente incrementado en las células CA2, CA1 del hipocampo, y en la corteza cerebral, en los animales sacrificados 6 h después de la etapa II del kindling. Estos resultados, junto a la relativa preponderancia de la expresión de PPII en estas regiones comparada con la del mesencéfalo o el tallo cerebral, apoyan la idea de que la PPII tiene un papel importante en la modulación del efecto del TRH sobre las funciones cognitivas, locomotoras y sensoriales (Heuer 1998).

La proporción del aumento en la expresión de la PPII en la etapa II (6 horas) coincide con el aumento en su actividad a las 24 horas de sacrificio, y es este momento, los niveles de RNAm regresan a los basales.

La inhibición de la etapa V tanto en actividad como en niveles de RNAm concuerdan con la disminución en la unión de los receptores de TRH encontrada en las mismas regiones durante el establecimiento del kindling (Kubek 1993), lo que apoya la localización post-sináptica de la enzima y su relevancia en la función de TRH como neuromodulador, puesto que su receptor está modificado.

**Aquí se evidencia que el kindling amigdalino activa la vía TRHérgica, y tal como se planteó en la hipótesis, esto permitió identificar cambios en los niveles de RNAm de la enzima PPII desde las primeras etapas. Estos cambios son previos a los encontrados en su actividad, lo que sugiere que son reflejo de una regulación transináptica de la síntesis de la enzima.**

**Su participación en los mecanismos compensatorios en los que el TRH participa durante la epileptogenesis parece relevante, pero no está definida.**

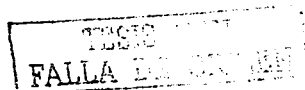
Dado que la estimulación eléctrica de este modelo tiene como blanco principal las neuronas postsinápticas y existe evidencia indirecta de que la PPII se encuentra en este tipo de neuronas, pudiera sugerirse que el kindling regula la síntesis de la enzima y que ésta participa en el control de la epileptogenesis, regulando la concentración del péptido en la sinapsis.

En función de los tiempos en que se modifica la síntesis de la PPII (6 horas etapa II y 2 horas etapa V), pudiera esperarse una activación previa de factores de transcripción com *c-fos*.

Los estudios de hibridización *in situ*, permiten identificar las células que efectivamente responden al kindling modificando la síntesis de PPII. Esto abre la posibilidad de definir los receptores de las células responsivas y por lo tanto diseñar nuevas estrategias para delinear su regulación en diferentes condiciones.

La activación de las vías TRHérgicas con este modelo abre muchas posibilidades sobre los mecanismos y moléculas responsables de la regulación transináptica de la PPII. El reto siguiente involucra la búsqueda de estrategias para identificar el papel del TRH con la epileptogenesis y con conductas modificadas durante el kindling. Esto llevó a utilizar otro modelo de activación del metabolismo de TRH en las mismas regiones cerebrales pero que induce otras conductas e involucra mecanismos de acción diferentes, que es la inyección de etanol intraperitoneal.





### Modelo de la inyección i.p. de etanol.

El etanol inyectado intraperitonealmente activa la vía TRHérgica en el SNC a los tiempos de 30 min a 1 hora. Las diferentes regiones analizadas presentan cambios en el contenido de TRH, en la expresión de su gen (hipocampo, hipotálamo, corteza frontal), en la liberación de TRH y en la actividad de la enzima que lo degrada. Si bien, el etanol actúa en todo el SNC y no se han identificado sus receptores específicos, el efecto que tiene inyectado intraperitonealmente en el metabolismo de TRH sigue un patrón diferente para cada región y en algunas de ellas, está en relación o con la conducta que presentan los animales, o con la función que regula el área del cerebro en cuestión.

Así, la inyección i.p. de etanol resulta ser un modelo ideal para definir el nivel de regulación de la enzima PPII.

El etanol administrado en forma aguda (3g/Kg de peso) induce narcosis en los animales aproximadamente 5 minutos después del tratamiento despertando alrededor de una hora y media después. En este lapso de tiempo los cambios en el contenido de TRH se observaron principalmente en el n. accumbens (disminución) e hipocampo (aumento), mientras que a partir de las 6 horas regresaron a sus niveles normales. Que la concentración de TRH se encuentre modificada en el n. accumbens durante el tiempo que dura la narcosis del animal concuerda con la capacidad que tiene el TRH como agente analéptico. El péptido interacciona con las neuronas que utilizan dopamina como neurotransmisor y cuya síntesis es disminuída por el etanol (*French 1993*).

Puesto que los animales con mayor sensibilidad al efecto narcótico del etanol presentan disminución en la actividad de la tirosina hidroxilasa en un 30-60%, y esto es revertido por una inyección i.c.v. de TRH (0.1 a 20µg), existe la posibilidad de que el péptido bloqueé el efecto del etanol aumentando la actividad de las vías dopaminérgicas (*French 1993*). Los resultados obtenidos apoyan esta hipótesis. A las 6 horas p.i. la concentración de TRH está normalizada y los animales se encuentran ya despiertos.

La disminución en el contenido de TRH en esta región parece ser debida a un aumento en la liberación del péptido (con una posible activación de las vías dopaminérgicas), ya que se presenta un subsecuente aumento en la síntesis del péptido que contribuye a normalizar los niveles de TRH a las 6 horas después de la inyección. El etanol puede afectar este evento modificando la expresión de *c-fos* en el n. accumbens o en neuronas del hipocampo que proyectan hacia esta región (*Crabbe 1997*), o bien ser un efecto indirecto del etanol sobre las neuronas glutamatérgicas del hipocampo ya que éstas innervan el n. accumbens (*Criado 1995*). Esto ha sido propuesto en otros modelos experimentales (*Uribe 1993*) y se ha observado para diferentes

péptidos en el SNC (Goodman 1991) el acoplamiento del mecanismo que induce la liberación con el de síntesis.

En el **hipotálamo** también disminuyó el contenido de TRH pero sólo a las 6 horas después de la inyección. En estas neuronas se evidencia la activación de la liberación del TRH si observamos que las concentraciones de TSH séricas se encuentran reducidas una hora p.i. pero a las 6 horas cuando el contenido del péptido disminuye, se encuentran normales (**Gráfica 21**). Estos resultados concuerdan con el efecto que el tiene el TRH sobre la temperatura corporal después de la inyección de etanol. Este, induce hipotermia y disminución de los niveles de hormonas tiroideas, lo que provoca un aumento en la expresión del gen de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo de animales mantenidos a 25°C, así como de su liberación (Arancibia 1983, Zoeller 1990, Uribe 1993). De hecho se ha visto que el mecanismo que estimula la secreción está acoplado al que estimula la síntesis en estas células, ya que la expresión genética neural está regulada por la actividad sináptica y por despolarización de la membrana celular. Además el etanol reduce el incremento en contenido de RNAm de TRH en el NPV cuando los animales son sometidos a frío. El efecto del etanol sobre la síntesis de TRH es específico, ya que no cambian los niveles de RNAm de otras proteínas como la  $\beta$  actina en el NPV o vasopresina del NPV o del núcleo supraóptico (NSO), o el RNAm del TRH en otros núcleos del hipotálamo (cuantificado con técnicas de hibridización *in situ*) (Zoeller 1992). El acoplamiento entre liberación y síntesis se observa en nuestros resultados por la disminución en el contenido de TRH a las 6 horas p.i. y un aumento en su síntesis desde 1 hora hasta las 20 horas después de la inyección (**Gráfica 27**). El efecto del etanol puede ser directo sobre las neuronas de TRH, ó a través de la activación de las terminales adrenérgicas que innervan el NPV; pudiera ser secundario al hipotiroidismo que provoca el etanol, ya que en animales tratados con propiltiouracilo (PTU) o tratados con niveles muy altos de T3, el etanol no puede alterar los niveles del RNAm de TRH (Zoeller 1988). Existe la posibilidad de que el etanol altere la expresión de factores de transcripción y estos la síntesis de TRH (Crabbe 1997).

La amígdala y la corteza frontal (regiones involucradas en el abuso de drogas, en conductas depresivas y en aprendizaje), presentaron los mismos cambios en el metabolismo de TRH. La administración aguda de etanol induce la expresión de *c-fos* en el núcleo central de la **amígdala**, que representa un sustrato anatómico para las drogas de abuso participando en la vía de recompensa del SNC. El 70% de las neuronas inmunorreactivas para *c-fos* se identificaron como GABAérgicas y como el sustrato neuronal de las acciones del etanol en esta región (Morales 1998). Que las vías TRHérgicas se encuentren activadas en esta área después de 6 horas de la inyección de etanol en una región donde el etanol afecta neurotransmisores inhibidores,

argumenta en favor de la acción bloqueadora del péptido sobre los efectos del etanol, ahora sobre otra conducta, que es la de recompensa.

La **corteza frontal** mostró el mismo comportamiento en cuanto a los cambios en el contenido de TRH que la amígdala y el hipotálamo: reducción de aprox. el 60% a las 6 horas p.i. y recuperándose a los niveles normales a las 24 horas. Esta región está innervada principalmente por neuronas colinérgicas, y se ha implicado al TRH de esta área en el aprendizaje. El etanol disminuye la capacidad cognoscitiva de los animales, y el TRH i.c.v. la mejora a través de su efecto sobre las neuronas colinérgicas; la inyección de bloqueadores de receptores de acetilcolina (atropina) bloquean el efecto del TRH sobre esta función en animales inyectados con consumo crónico de etanol (*Itoh 1994, Ogasawara 1995, 1996*). El efecto analéptico del TRH también se encuentra relacionado con las vías colinérgicas ya que los antagonistas de la acetilcolina bloquean este efecto del TRH (*French 1993*). El etanol y el TRH interactúan en esta región sobre la actividad de los canales iónicos de los receptores a GABA; uno aumentando su actividad y el TRH disminuyéndola (*Barbieri 1997, Crews 1996*); o bien alterando la neurotransmisión glutamatérgica, lo que se ha visto en neuronas corticales en cultivo (*Stocca 1995, Kasparov 1994*). La depresión del SNC que provoca el etanol puede ser causada, al menos en parte, por su efecto sobre los receptores a NMDA. Después de inducir cambios en la expresión de *c-fos*, las enzimas proteína cinasa C (PKC) y/o proteína cinasa A (PKA) pueden fosforilar canales L de calcio dependientes de voltaje induciendo inactivación del sistema nervioso. El NMDA y el compuesto Bay K 8544 bloquean este efecto del etanol (*Crews 1996*). Que el contenido de TRH se encuentre modificado en la corteza frontal a las 6 horas de la inyección i.p. de etanol es otra evidencia de que se altera la vía TRHérgica en otra zona más donde el péptido tiene funciones caracterizadas. Los niveles de RNAm de TRH en esta zona, disminuyeron a la hora p.i. El papel del etanol en esta región parece inhibitorio.

El **hipocampo**, región bien estudiada por su participación en la facilitación de la memoria espacial (*Horita 1989*), y particularmente susceptible al estrés (*Meaney 1993*) mostró incrementos en los niveles de RNAm de TRH 1-6 horas después de la administración de etanol, mientras que el contenido del péptido se incrementó una hora después y regresó a valores basales a tiempos más largos. Sería de interés medir la liberación de TRH a una hora para definir si el nivel elevado del péptido se debe a inhibición de este evento y si se relaciona con la narcosis producida por el etanol. Los niveles de TRH no aumentaron después de las 6 horas, probablemente porque existe un aumento en la liberación que pudiera ser reflejo del efecto analéptico en el que se ha involucrado.

Que el etanol induzca narcosis, depresión de la capacidad cognoscitiva o de la conducta de recompensa o modificación de la memoria y, pueda alterar el

metabolismo del TRH en la neurona presináptica por el mismo mecanismo, es sujeto de estudios subsiguientes, ya que también existe la posibilidad de que el efecto del etanol sobre el TRH sea a través de la regulación de la síntesis y liberación de otras moléculas como el CRF (*Kakucska 1995*) ó la somatostatina (*Zoeller 1992*).

### **PPII actividad y síntesis.**

Los cambios en la actividad de la enzima debidos a la inyección i.p. de etanol reafirman que la ectopeptidasa es regulable en el SNC. La regulación bifásica que se observa en la corteza frontal y en el n. accumbens (**Gráficas 17,19**) ya se había mostrado en un estudio anterior, utilizando el kindling amigdalino como activador de la vía TRHérgica (*de Gortari 1995*).

Se presentan cambios en la actividad de la enzima previos a los de contenido de TRH sobre todo en la amígdala y en la corteza frontal, lo que hace pensar que no es el TRH quien modifica a la enzima.

El etanol que afecta tanto las neuronas presinápticas como postsinápticas puede ser el responsable de la modificación de la actividad de la enzima. *Fierros 1993* mostró que en células hipotalámicas en cultivo, el etanol tiene efecto sobre la actividad de la PPII. Las dosis bajas de etanol (5mM) disminuyen la actividad específica de la PPII a tiempos largos (24, 72 y 96 hrs), lo que apoya la idea de que el efecto puede ser a nivel transcripcional.

**En este estudio se observa que efectivamente, al menos uno de los niveles de regulación de la PPII es su transcripción.**

Las regiones cerebrales con cambios en la actividad de la enzima, presentan alteraciones previas en el contenido de RNAm de la PPII (identificado por RT-PCR). En la corteza frontal se observan los cambios más tempranos (30 min p.i. de etanol) que son una disminución de más del 60% en el contenido de RNAm de PPII, para después observar una disminución en actividad a la hora p.i. que puede deberse a la activación de genes inmediatos tempranos inducida por el etanol. La disminución en actividad de la PPII puede favorecer el aumento del efecto del TRH subsecuente (liberación máxima de las 6 horas p.i.) y éste contrarrestar la acción del etanol. El aumento en el contenido de RNAm de la PPII a las cuatro horas p.i. puede ser el mecanismo responsable del incremento en actividad observado a las 24 horas. Si este es un efecto del mismo etanol, quien puede alterar la concentración de los iones de calcio modificando la actividad de los receptores a NMDA, o bien del TRH liberado antes de las 6 horas (que no fue medido), quien activa factores de transcripción (*Iruchijima 1989, Li 1996, Straub 1990, Akita 1990, Yajima 1990*),

o de otro neurotransmisor coliberado por las neuronas activadas, queda por estudiarse.

El hipotálamo muestra actividad de la enzima modificada significativamente sólo a las 24 horas p.i. y es también precedida por un aumento en su síntesis (+40%) a las 16 horas, lo que concuerda con los valores normales en el contenido de TRH en ese momento. Esto hace pensar que la PPII puede regular la función del TRH, y no sólo actuar como un mecanismo meramente catalítico.

En el hipocampo no concuerdan los cambios en actividad de la enzima con los encontrados en el nivel de síntesis (**Gráfica 28**). Esto puede explicarse porque los cuerpos celulares del hipocampo que sintetizan PPII no tienen sus terminales en la misma región.

Bloquear los receptores a NMDA y los GABA utilizando una inyección i.p. de los antagonistas podría ayudar a definir su participación en la regulación de la PPII que aquí se evidencia. Pero sobre todo demostrar que el TRH está involucrado en conductas como el despertar de la narcosis y que la inactivación de la PPII tiene relevancia en la función del péptido en ésta u otras conductas son los retos a los que llevan estos resultados.

## VII CONCLUSIONES.

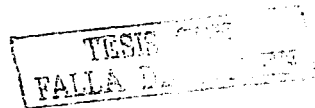
El kindling amigdalino y la inyección intraperitoneal de etanol activan la vía TRHérgica de las regiones cerebrales estudiadas.

La activación del metabolismo de TRH en estos dos modelos permite identificar cambios en la actividad y síntesis de la enzima PPII.

Uno de los niveles de regulación de la enzima durante la epileptogenesis, es su síntesis.

Los cambios en la actividad de la enzima pueden estar reflejando la regulación de sus niveles de RNAm, puesto que éstos más tempranos.

Las células que responden con aumentos en los niveles de RNAm de la PPII en la etapa II del kindling amigdalino son las CA2, CA1 del hipocampo, así como las de la corteza piriforme.



### VIII. REFERENCIAS.

Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H, (1983). Direct evidence of short term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 37: 225-228.

Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Suzuki K, 1990. Possible role of  $Ca^{2+}$ -independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, in Thyrotropin-releasing hormone-stimulated signal transduction: differential down-regulation of nPKC epsilon in  $GH_4C_1$  cells. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 184-9.

Barbieri M, Nistri A, 1997. Effects of the neuropeptide thyrotropin-releasing hormone on GABAergic synaptic transmission of CA1 neurons of the rat hippocampal slice during hypoxia. *Peptides* 18: 585-591.

Barros F, Gómez-Varela D, Vilorio CG, Palomero T, Giraldez T, de la Peña P, 1998. Modulation of human erg  $K^+$  channel gating by activation of a G-protein-coupled receptor and protein kinase C *J Physiol* 511 (Pt2): 333-46.

Bauer K, 1987. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 330: 375-377.

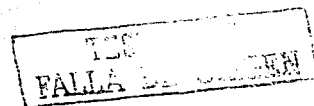
Bauer K, 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH). Regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie (Paris)* 70: 69-74.

Bauer K, 1994. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem*. 224: 387-396.

Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Denef C, 1990. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 127: 1224-1233.

Bauer CK, Davison I, Kubasov I, Swarcz JR, Mason WT, 1994. Different G proteins are involved in the bifasic response of clonal rat pituitary cells to TRH. *Pflugers Arch* 428:17-25.

Bauer K, Kleinkauf H, 1980. Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. *Eur J Biochem* 106: 107-117.



Bauer K, Nowak P, 1979. Characterization of a thyroliberin-degradin serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem* 99: 239-246.

Bengzon J, Kokaia Z, Ernfors P, Kokaia M., et al 1993. Regulation of neurotrophin and *trkA*, *trkB*, and *trkC* tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. *Neurosci* 52: 433-446.

Bhat RV, Tausk FA, Baraban JM, Mains RE, Eipper BA, 1993. Rapid increases in peptide processing enzyme expression in hippocampal neurons. *J Neurochem* 61: 1315-1322.

Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV, 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyro - glutamyl -histidyl -prolineamide. *Biochem Biophys Res Commu.* 37: 705-710.

Bonhaus DW, Rigsbee CC and McNamara JO, 1987. Intranigral dynorphin 1-13 suppresses kindled seizures by a naloxone insensitive mechanism. *Brain Res* 405: 358-363.

Braitman DJ, Auker CR, and Carpenter DO, 1980. Thyrotropin-releasing hormone has multiple actions in cortex. *Brain Res* 194: 244-248.

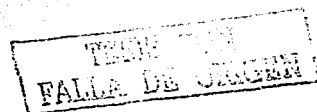
Breese GR, Cott JM, Cooper BR, Prange AJ, Lipton MA, 1974. Antagonism of ethanol narcosis by thyrotropin releasing hormone. *Life Sci* 14: 1053-1063.

Breese GR, Coyle S, Frye GD, Mueller RA, 1985. Effects of TRH, ethanol and TRH-ethanol combination on activity in rats with altered monoamine content. *Pharmacol Biochem Behav* 22: 1013-1018.

Bulant M, Toussel J.P, Astier H, Nicolas O, Vaudry H., (1990). Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biological active peptide, prepro-TRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc Natl Acad Sci* 87: 4439-4443.

Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, Vale W, Guillemin R, 1969. Derives polipeptidiques de synthèses doues d'activite hypophysiotropic TRF. *C.R. Acad Sci* 269: 1870-1873.

Burnham WM, Cotrell G A. The GABA hypothesis of kindling. Kindling 4 edited by J.A. Wada, Plenum Press N.Y. 1990.



Burnham WM, Racine R J, Okazaki MO. Kindling Mechanisms: II Biochemical Studies. Kindling 3, edited by J.A. Wada. Raven Press, N.Y. 1986.

Burt DR, Snyder S H 1975. TRH: apparent receptor binding in rat brain membranes. *Brain Res* 93: 309-328.

Cain DP, Corcoran ME, 1984. Intracerebral Beta-endorphin, met-enkephalin and morphine: kindling of seizures and handling-induced potentiation of epileptiform effects. *Life Sci.* 34:2535-2542.

Calzá L, Giardino L, Ceccatelli S, Zanni M, Elde R, Hokfelt T, 1992. Distribution of Thyrotropin-Releasing Hormone receptor messenger RNA in the rat brain: An "in situ" hybridization study. *Neurosci* 51: 891-909.

Cao J, O'Donnel D, Vu H, Payza K, Pou C, Godbout C, Jakob A, Pelletier M, Lembo P, Ahmad S, Walker P, 1998. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem.* 273 : 32281-32287.

Cicero TJ, 1981. Neuroendocrinological effects of alcohol. *Ann Rev Med* 32: 123-142.

Cole AJ, Abu-Shakra S, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF, 1990. Rapid rise in transcription factor mRNAs in rat brain after electrochock-induced seizures. *J. Neurochem* 55:1920-1927.

Corcoran ME. Studies of some Neurochemicals and Kindling. Kindling 3 edited by J.A. Wada. Raven Press, N.Y. 1986.

Cottrell GA, Nyakas C, Bohus B, 1988. Hippocampal kindling-induced afterdischarge and behavioural depression: immediate and long-term attenuation by opiate antagonists. *Eur J Pharmacol* 150: 1-8.

Cottrell GA, Bohus B, 1987. Immediate and long-term effects of opiate antagonists on postictal behaviour following amygdala kindling in the rat. *Eur J Pharmacol* 141:417-421.

Crabbe JC, 1997. Where does alcohol act in the brain. *Molecular Psychiatry* 2: 17-20.

Crews FT, Morrow L, Criswell H, Breese G, 1996. Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39: 283-367.





Criado JR, Lee RS, Berg GI, Henriksen SJ, 1995. Sensitivity of nucleus accumbens neurons in vivo to intoxicating doses of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 19:164-9.

Cruz C, Charli JL, Vargas MA, Joseph-Bravo P, 1991. Neuronal Localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J. Neurochem.* 56:1594-1601.

Cupello A, Hydén H, 1981. On the presence of met 5-enkephalin receptors on the plasma of Deiters' neurons and their modulation of GABA transport. *J Neurosci Res* 6:579-583.

Czekay G, Bauer K, 1993. Identification of the TRH-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochem J* 290: 921-926.

Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P, 1988. The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 13: 237-242.

Charli JL, Cruz C, Ponce G, Vargas MA, Méndez M, Cisneros M, Pasten J, Joseph-Bravo P, 1989b. Physiological relevance of pyroglutamate aminopeptidase II. *Annals NY Acad Sci* 553: 563-564.

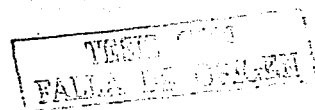
Charli JL, Méndez M, Joseph-Bravo P, Wilk S, 1987. Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9: 373-378.

Charli JL, Méndez M, Vargas MA, Cisneros M, Asai M, Joseph-Bravo P, Wilk S., 1989a. Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 14: 191-196.

Charli JL, Vargas MA, Cisneros M, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P, Bourdais J, Pérez L, Uribe RM, Joseph-Bravo, 1998. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology* 6: 45-57.

Chiasson BJ, Hong GL, Robertson HA, 1997. Putative roles for the inducible transcription factor *c-fos* in the central nervous system: Studies with antisense oligonucleotides. *Neurochem Int.* 31: 459-475.

Chiasson BJ, Dennison Z, Robertson A., 1995. Amygdala kindling and immediate-early genes. *Mol Brain Res* 29: 191-199.



Chomczynski P, Sacchi, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

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. *Brai. Res* 679: 144-150.

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.

De Gortari P, González-Alzati ME, Cisneros M, Joseph-Bravo P, 1999. TRH metabolism is differentially affected by fasting in infant compared to adult rats. *Sometido a Regul Peptides*.

Deiseroth K, Bito H, Tsien RW, 1996. Signaling from synapse to nucleus: Postsynaptic CREP phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16: 89-100.

De Léan A, Ferland D, Drouin J, Kelly PA, Labrie F, 1978. Modulation of pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* 100:1496-1504.

Dingledine R, Iversen LL, Breuker E, 1978. Naloxone as a GABA antagonist: evidence from iontophoretic, receptor binding and convulsant studies. *Eur J Pharmacol* 47:19-27.

Dragunow M, Robertson HA, 1987. Kindling stimulation induces *c-fos* protein (s) in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature* 329: 441-442.

Dragunow M, Currie RL, Faull RLM, Robertson HA, Jansen K, 1989. Immediate-early genes, kindling and long term potentiation. *Neurosci & Behav Rev* 13: 301-313.

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G, 1990. Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 15: 31-36.

Erdtmann-Vourliotis M, Riechert U, Mayer P, Grecksch G, Holtt V, 1998. Pentylentetrazol (PTZ)-induced c-fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment with naloxone. *Brain Res* 792: 299-308

Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O., 1991. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 7: 165-176

Fierros Zárata, GS. Regulación de la actividad de la piroglutamil aminopeptidasa II en hipotálamo fetal de rata. Tesis UABJO 1993.

Fleming AA, Todd AJ, 1994. Thyrotropin-releasing hormone and GABA-like immunoreactivity coexist in neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*. 638: 347-351.

French T.A., Masserano J.M. Weiner N., 1993. Influence of Thyrotropin-Releasing Hormone and Catecholaminergic Interactions on CNS Ethanol Sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 99-106.

Frenk H, Engel J, Ackerman RF, Shavit J, and Liebeskind JC, 1979. Endogenous opioids may mediate postictal behavioral depression in amygdala-kindled rats. *Brain Res* 167: 435.

Friedman TC, Wilk S, 1986. Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J Neurochem* 46: 1231-1239

Fukuda N, Nishimura O, Shikata M, et al., 1980. Synthesis and pharmacology of TRH analog to separate central nervous action from endocrine activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 28: 1667-72.

Fuson KS, Aydelotte MR, Sattin A, Kubek MJ, 1990. Thyrotropin-releasing hormone (TRH)mRNA is increased in specific limbic subregions following electroconvulsive seizures (ECS) as determined by in situ hybridization histochemistry (ISHH) *Soc Neurosci Abstr* 16: 1029.

Gall CM, Isackson PJ, 1989. Limbic seizures increase neuronal plasticity of messenger RNA for Nerve Growth Factor. *Science* 245: 758-761.

TRH  
FALSA

Gammon CM, Oxford GS, Allen AC, McCarthy KD, Morell P, 1989. Diacylglycerol modulates action potential frequency in GH3 pituitary cells: correlative biochemical and electrophysiological studies. *Brain Res* 479: 217-224.

Garat B, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P, 1985. Presence of a membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neuropeptides* 6: 27-40.

Gershengorn MC, 1978. Biohormonal regulation of the thyrotropin-releasing hormone receptor in mouse pituitary thyrotropic tumor cells in culture. *J Clin Invest* 62: 937-943.

Goddard GV, 1967. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214: 1021-1021.

Goodman RH, 1990. Regulation of neuropeptide gene expression. *Annu Rev Neurosci* 13: 111-127.

Grosvenor CE, Mena F, 1980. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107: 863-868.

Gruol DL, Barker JL, Smith TG, 1980. Naloxone antagonism of GABA-evoked membrane polarizations in cultured mouse spinal cord neurons. *Brain Res* 198: 323-332.

Haisenleder, DJ, Orotlano GA, Dalkin AC, Marshall JC, 1992. Differential actions of TRH pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 130: 2915-2923.

Hall Z W. An Introduction to Molecular Neurobiology. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts 1992.

Heuer H, Ehrchen J, Bauer K, Schäfer MKH, 1998. Region-specific expression on thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur J Neurosci* 10: 1465-1478.

Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE, 1995. The human thyrotropin releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* 9: 540-550.

TESIS CON  
FALLA DE

Horita A et al., 1989. TRH analog MK-771 reverses neurochemical and learning deficits in medial septal-lesioned rats. *Peptides* 10:121-4.

Hughes PE, Young D, Preston KM, Yan Q, Dragunow M, 1998. Differential regulation by MK-801 of immediate early genes, brain derived neurotrophic factor and Trk receptor mRNA induced by a kindling afterdischarge. *Brain Mol Brain Res* 53:138-51.

Inanaga K, Inoue Y, 1981. Effect of a thyrotropin releasing hormone analog in patients with myoclonus epilepsy. *Kurume Med J* 28: 201-10.

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.

Iruchijima T, Mori M, 1989. Regional dissociation of cyclic AMP and inositol phosphate formation in response to thyrotropin-releasing hormone in the rat brain. *J. Neurochem* 52: 1944-6.

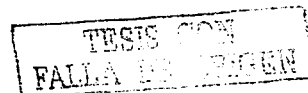
Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM, 1991. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron* 6: 937-948.

Itadani H, Nakamura T, Itoh J, Iwaasa H, Kanatani A, Borokowski J, Ihara M, Ohta M, 1998. Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 250:68-71

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.

Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios M, Kordon C, 1979. Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from a rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104: 801-806.

Joseph-Bravo P, Fresán ME, Cisneros M, Vargas MA, Charli JL, 1994. Pyroglutamyl peptidase II activity is not in the processes of bulbospinal TRHergic neurons. *Neurosci Lett* 178: 243-246.



Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Pérez-Martínez L, Zoeller RT, Charli JL, 1998. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 18: 231-247.

Kahn A, Mirolo MH, Claypoole M, Hughes D., 1993. "Low-Dose Thyrotropin Releasing Hormone effects in cognitively impaired alcoholics". *Alcohol Clin Exp Res* 17: 791-796.

Kakuscka I, Qi Y, Lechan RM, 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic TRH gene expression in parallel with CRH. *Endocrinology* 136: 2795-2808.

Kang H, Schuman EM, 1996. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273: 1402-1406.

Kasparov S, Pawelzik H, Zieglgänsberger W, 1994. Thyrotropin-releasing hormone enhances excitatory postsynaptic potentials in neocortical neurons of the rat in vitro. *Brain Res* 656:229-235.

Kim SY, Post RO, Rosen JB, 1996. Differential regulation of basal and kindling-induced TRH mRNA expression by thyroid hormone in the hypothalamic and limbic structures. *Neuroendocrinol* 63: 297-304.

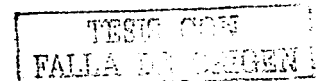
Kirby, KS, 1968. Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. *Methods Enzymol* 12: 87-99.

Knoblach SM, Kubek MJ, 1997. Changes in thyrotropin-releasing hormone levels in hippocampal subregions induced by a model of human temporal lobe epilepsy: effect of partial and complete kindling. *Neuroscience* 76: 97-104.

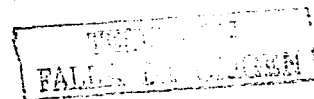
Koenig ML, Yourick DL, Meyerhoff JL, 1996. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) attenuates glutamate-stimulated increases in calcium in primary neuronal cultures. *Brain Res* 730:143-149.

Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT, 1987. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci* 84: 7329-7333.

Kretschmer BD, Schmidt WJ, 1996. Behavioral effects mediated by the modulatory glycine site of the NMDA receptor in the anterodorsal striatum and nucleus accumbens. *J Neuroscience* 16: 1561-1569.



- Kubek MJ, Knoblach BS, Sharif NA, Burt DR, Buterbaugh GG, Fuson KS, 1993. Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann Neurol* 33: 70-75.
- Kubek MJ, Low WC, Sattin A, Morzorati DL, Meyerhoff JL, Larsen SH, 1989. Role of TRH in seizure modulation. *Ann N. Acad Sci* 553: 286-303.
- Kubek MJ, Sattin A, 1989. Effect of electroconvulsive shock on the content of thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Life Sci* 34: 1149-1152.
- Labiner D, Butler L, Cao Z, Hosford D, Shin C, McNamara J, 1993. Induction of c-fos mRNA by kindled seizures: complex relationship with neuronal burst firing. *J Neurosci* 13: 744-751.
- Ladram A, Bulant M, Delfour A, Montagne JJ, Vaudry H, Nicolas P, 1994. Modulation of the biological activity of thyrotropin releasing hormone by alternate processing of pro-TRH. *Biochimie* 76: 320-328.
- Lechan RM, Segerson TP, 1989. Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain: observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Annals of the NY Acad Sci* 553: 29-59.
- Lechan RM, Toni R. Thyrotropin-Releasing Hormone Neuronal Systems in the Central Nervous System. Neuroendocrinology. C.V. Demeroff. C.R.C. Press. Boca Raton, 1992. pp 279-330.
- Lechan RM, Wu PW, Jackson IMD, 1986. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology*, 119: 1210.
- Lechan RM, Wu PW, Jackson IMD, 1987. Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology* 121:1879.
- Lee SL, Stewart K, Goodman R, 1988. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J. Biol Chem* 263: 16604-16609.
- Lee SL, Yang IM, Lin A, 1993. A multifunctional site in the promoter of the rat thyrotropin releasing hormone (TRH) gene binds c-Jun, CREB, and the thyroid hormone receptor. *The Endocrine Society 75th Annual Meeting, Las Vegas, NV*, p.532.



Li SL, Coughnon N, Bresson-Bepoldin I, Zhas SJ, Schegel W, 1996. C-fos mRNA and Fos protein expression is induced by  $Ca^{+2}$  influx in  $GH_3B_6$  pituitary cells. *JMM Endocrinol* 16(3): 229-38.

Lin J, Wilk S, 1998. Quantitation and regulation of pyroglutamyl peptidase II messenger RNA levels in rat tissues and  $GH_3$  cells. *Neuroendocrinology* 67: 197-208.

Lowry OH, Rosenbrough N J, Randall RJ, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.

Luo L, Bruhn T, Jackson IMD, 1995. Glucocorticoids stimulate thyrotropin releasing gene expression in cultural hypothalamic neurons. *Endocrinology* 136: 4945-4959.

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J, 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Mason GA, Rezvani AH, Overstreet DH, Hamed M, Walker CH, Yang Y, Garbutt JC, 1997. Involvement of dopamine D2 receptors in the suppressive effect of the thyrotropin-releasing hormone analog TA-0910 on alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 1623-1629.

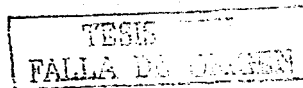
Matsumoto A, Kumagai T, Takeuchi T, Miyazaki S, Watanabe K, 1987. Clinical effects of thyrotropin-releasing hormone for severe epilepsy in childhood: A comparative study with ACTH therapy. *Epilepsia* 28: 49-55.

Matsumoto A, Kumagai T, Takeuchi T, Miyazaki S, Watanabe K, 1989. Factors influencing effectiveness of thyrotropin-releasing hormone therapy for severe epilepsy in childhood: significance of serum prolactin levels. *Epilepsia* 30: 45-49.

Méndez M, Cruz C, Joseph-Bravo P, Wilk S, Charli JL, 1990. Evaluation of the role of prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 17: 55-62.

Meyer 1899. En Crews FT, Morrow L, Criswell H, Breese G, 1996. Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39: 283-367.

Meyerhoff JL, Bates VE, Kubek MJ, 1990. Elevated TRH levels in pyriform cortex after partial and fully generalized kindled seizures. *Brain Res* 525: 144-148.





McNamara JO, 1994. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. *Journal Neurosci* 14: 3413-3425.

McNamara JO, Bonhaus DW, Nadler JV, Yeh GC. N-Metil-D-Aspartate (NMDA) receptors and the kindling model. Kindling 4 edited by J.A. Wada. Plenum Press N.Y. 1990.

Miyamoto M, Nagai Y, Narumi S, Saji Y, Nagawa Y, 1982. TRH and its novel analog (DN-1417) antipentobarbital action and involvement of cholinergic mechanism. *Pharm Biochem Behav* 17: 797-806.

Miyamoto M, Nagawa Y, 1977. Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *Eur J Pharmacol* 44: 143-152.

Miyamoto T, Suzuki S, Degroot LJ, 1993. High affinity and specificity of dimeric binding of thyroid hormone receptors to DNA and their ligand dependent association. *Mol Endocrinol* 7: 224-231.

Moneta ME, Höllt V, 1990. Perforant path kindling induces differential alterations in the mRNA levels coding for prodynorphin and proenkephalin in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 110: 273-278.

Monno A, Rizzi M, Samanin R, Vezzani A, 1993. Anti-somatostatin antibody enhances the rate of hippocampal kindling in ratas. *Brain Res* 602:148-152.

Morales M, Criado JR, Sanna PP, Henriksen SJ, Bloom FE, 1998. Acute ethanol induces c-fos immunoreactivity in GABAergic neurons of the central nucleus of the amygdala. *Brain Res* 798: 333-336.

Morgan JI, Curran T, 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14: 421-451.

Morrel F, Toledo-Morrel L. Kindling as a model of neuronal plasticity. Kindling 3 edited by J.A. Wada. Reven Press, N.Y. 1986

Morzorati S, Kubek MJ, 1993. The effect of TRH on ethanol-induced sedation in alcohol-preferring and non-preferring rats. *Neuropeptides* 25: 283-287.



Nagai Y, Narumi S, Saji Y, Nagawa Y, 1985. Antireserpine action in electroconvulsive threshold and involvement of serotonergic (5-HT) mechanism in mice. *Folia Pharmacol Jpn* 85: 221-230.

Nakamura J, Uchimura N, Yamada S, et al., 1984. The anticonvulsant effect of TRH analog (DN-1417) and TRH-T: their effect on electroconvulsive threshold. *J Jpn Epil Soc.* 2:76-83.

National Institute on Alcohol and alcoholism. Research monograph No. 23 Alcohol and the endocrine system U.S. *Department of Health and Human Services*, 1993.

Nemeroff CB, Prange AJ, Bissett GJ, Breese GR, Lipton MA, 1975. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its beta-alanine analogue potentiation of the anticonvulsant potency of phenobarbital in mice. *Psychopharmacol Commun* 1: 305-307.

Nikodemova M, Benicky J, Brtko J, Strbak V, 1998. Chronic ethanol drinking and food deprivation affect rat hypothalamic-pituitary-thyroid axis and TRH in septum. *Endocrine* 9: 213-218.

Nistri A, Fisher ND, Gurnell M, 1990. Block by the neuropeptide TRH of an apparently novel  $K^+$  conductance of rat motoneurons. *Neurosci Lett* 120: 25-30.

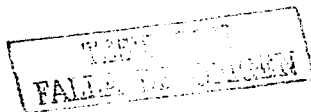
Ogawa N, Hirose Y, Mori A, Kajita S, Sato M, 1985. Involvement of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neural system of the brain in petylenetetrazole-induced seizures. *Regul Pept* 12: 249-256.

O'Connor B, O'Cuinn G, 1984. Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea pig brain. *Eur J Biochem* 144: 271-278.

O'Connor B, O'Cuinn G, 1985. Purification of and kinetic studies on a synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 150: 47-52.

O'Connor B, O'Cuinn G, 1987. Active site studies on a narrow specificity thyroliberin-hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase purified from synaptosomal membrane of guinea-pig brain. *J Neurochem* 48: 676-680.

O'Cuinn G, O'Connor B, Elmore M, 1990. Degradation of thyrotropin-releasing hormone and luteinising hormone-releasing hormone by enzymes of brain tissue. *J Neurochem* 54: 1-13.



ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

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.

Ogasawara T, Ukai Y, Tamura M, Kimura K, 1995. NS-3 (CG3703), and analog og thyrotropin-releasing hormone, ameliorates cognitive impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 499-503.

O'Leary R, O'Connor B, 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone. *J of Neurochem* 65: 953-963.

Ono M, Akiyama K, Tsutsui K, Kuroda S, 1994. Differential changes in the activities of multiple protein kinase C subspecies in the hippocampal-kindled rat. *Brain Res* 660: 27-33.

Overton 1901. En Crews F.T., Morrow L, Criswell H and Breese G., 1996. Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39: 283-367.

Paxinos G, Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd ed. Academic Press, Orlando, FL. 1986.

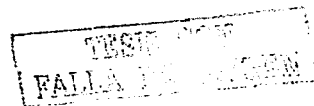
Pei Q, Burnet PW, Grahame-Smith DG, Zetterstrom TS, 1997. Differential effects of acute and chronic electroconvulsive shock on the abundance of messenger RNAs for voltage-dependent potassium channel subunits in the rat brain. *Neurosci* 78: 343-350.

Pérez-Martínez L., Carreón RA, Gómez-Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph-Bravo P., 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68: 345-354.

Perrone MH, Hinkle PM, 1997. Regulation of pituitary receptors for thyrotropin-releasing hormone by thyroid hormone. *J Biol Chem* 253: 5168-5173.

Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P, 1988. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48: 211-213.

Prange AJ, Wilson IC, Lara PP, Alltop LB, Breese O.R., 1972. Effects of Thyrotropin Releasing Hormone in depression. *Lancet* 11: 999-1002.



Racine RJ, 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I Afterdischarge threshold. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.* 32: 269-279.

Racine RJ, 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II Motor Seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol* 32: 281-294.

Racine RJ, Burnham WM, Gilbert M, Kairiss. Kindling mechanisms: I Electrophysiological Studies. Kindling '3 edited by J.A. Wada. Raven Press N.Y. 1986.

Reckling JC, 1990. Excitatory effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in hypoglossal motoneurons. *Brain Res.* 510: 175-179.

Reckling JC, 1992. Interactions between thyrotropin-releasing hormone (TRH) and NMDA receptor-mediated response in hypoglossal motoneurons. *Brain Res.* 578: 289-296.

Renaud LP, Blume HW, Pittman QJ, Lamour Y, Tan AT 1979. Thyrotropin-releasing hormone selectively depresses glutamate excitation of cerebral cortical neurons. *Science* 205:1275-1277.

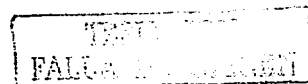
Renming X, Ishihara K, Sasa M, Ujihara H, Momiyama T, Fujita Y, Todo N, Serikawa T, Yamada J, Takaori S, 1992. Antiepileptic effects of CNK-602A, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on absence-like and tonic seizures of spontaneously epileptic rats. *Eur J Pharmacol* 223:185-192.

Rezvani AH, Garbutt JC, et al., 1992. Attenuation of Alcohol Preference in alcohol-prefering rats by a novel TRH analogue, TA-0910. *Alcohol Clin Exp Res* 16:326-330.

Rocha L, Maidment N, Evans C, Ackerman RF, Engel J, Jr. 1994. Microdialysis reveals changes in extracellular opioid peptide levels in amygdala induced by amygdaloid kindling stimulation. *Exp Neurol* 126: 277-283.

Rocha L, Kaufmann DL, 1998. In vivo administration of c-fos antisense oligonucleotides accelerates amygdala kindling. *Neurosci Lett* 241: 111-114.

Rosen JB, Abramowitz J, Post RM, 1993. Colocalization of TRH mRNA and Fos-like immunoreactivity in limbic structures following amygdala kindling. *Mo. and Cell Neurosci* 4: 335-342.



Rosen JB, Weiss SRB, Post RM, 1994. Contingent tolerance to carbamazepine: alterations in TRH mRNA and TRH receptor binding in limbic structures. *Brain Res* 651: 252-260.

Rosen JB, Cain CJ, Weiss SR, Post R, 1992. Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 15: 247-255.

Sato M, Morimoto K, Wada JA, 1984. Antiepileptic effects of thyrotropin-releasing hormone and its new derivative. *Epilepsia* 25: 537-44.

Sato M, Kajita S, Ogawa N, Okamoto MW. Amygdaloid kindling and thyrotropin-releasing hormone. Kindling 3, edited by J.A. Wada. Raven Press, New York, pp 319-332, 1986.

Sato M, Kajita S, Okamoto MW, et al., 1985. Anticonvulsant effects of thyrotropin releasing hormone analog (DN-1417) and changes in brain monoamines. *Psychiat Neurol Jpn* 87: 176-85.

Sattin A, Pekary AE, Loyd RL, 1999. TRH in therapeutic and nontherapeutic seizures: affective and motor functions. *Pharmacol Biochem Behav* 62: 575-583.

Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM, 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238: 78-80.

Segerson TO, Hoefler H, Childers H, Wolfe HJ, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM., 1987a. Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 121: 98.

Schauder B, Schomburg L, Kohrle J, Bauer K, 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Pro. Natl Acad Sci* 91: 9534-9538.

Schomburg L, Bauer K, 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 136: 3480-3484.

Schomburg L, Bauer K, 1997. Regulation of the adenohypophyseal thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol. *Endocrinology* 138: 3587-3593.



Sharif N, Burt D, 1983. Receptors for thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rabbit spinal cord. *Brain Res* 270: 259-263.

Sharif NA, Towle AC, Burt DR, Mueller RA, Breese GR, 1989. Cotransmitters: differential effects of serotonin (5-HT)-depleting drugs on levels of 5-HT and TRH and their receptors in rat brain and spinal cord. *Brain Res* 480: 365-371.

Shinoda H, Nadi NS, Schwartz JP, 1991. Alterations in somatostatin and proenkephalin mRNA in response to a single amygdaloid stimulation versus kindling. *Mol Brain Res* 11: 221-226.

Shinoda H, Schwartz JP, Nadi NS, 1989. Amygdaloid kindling of rats increases preprosomatostatin mRNA and somatostatin without affecting glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA or GAD. *Mol Brain Res* 5: 243-246.

Sivarao DV, Krowicki ZK, Abrahams TP, Hornby PJ, 1997. Intracisternal antisense oligonucleotides to TRH receptor abolish TRH-evoked gastric motor excitation. *Am J Physiol* 271: G1372-G1381.

Smith MA, Weiss SRB, Abedin T, Kim H, Post RM, Gold PW, 1991. Effects of amygdala kindling and electroconvulsive seizures on the expression of corticotropin-releasing hormone in the rat brain. *Mol and Cell Neurosci* 2: 103-116.

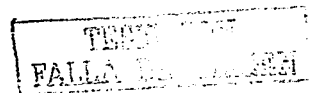
Stevenin B, Lee SL, 1995. Hormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone (TRH) gene. *Endocrinologist* 5: 286-296.

Stocca G, Nistri A, 1994. Modulation by TRH of NMDA-elicited responses of CA1 neurones of the rat hippocampal slice preparation. *Neurosci Lett* 166: 139-142.

Stocca G, Nistri A, 1995. Enhancement of NMDA receptor mediated synaptic potentials of rat hippocampal neurones in vitro by thyrotropin-releasing hormone. *Neurosci Lett* 184: 9-12.

Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershenghorn MC, 1990. Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci* 24: 9514-9518.

Torres H, Charli JL, González-Noriega A, Vargas MA, Joseph-Bravo P, 1986. Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem Int.* 9: 103-110.



Travagli RA, Gillis RA, Vicini S, 1992. Effects of the thyrotropin-releasing hormone on neurons in rat dorsal motor nucleus of the vagus, in vitro. *Am J Physiol* 263: G508-G517.

Trouslard J, Demeneix BA, Feltz P, 1989. Spontaneous spiking activities of procine pars intermedia cells: effects of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 50: 33-43.

Ueda S, Nakamura J, Inanaga K., 1983. Clinical effects of TRH analog (DN-1417) on the Lennox syndrome. *J Jpn Epilepsy Soc* 1: 31-39.

Uribe RM, Jasso P, Morales C, de Gortari P, Charli JL, Joseph-Bravo P, 1996. In situ hybridization histochemical analysis of pyroglutamyl peptidase II mRNA distribution in the rat brain. *26th Annual Meeting, Society for Neuroscience*, Washington D.C.

Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli JL, 1991. Some events of TRH metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinol* 54: 493-498.

Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P, 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58:140-145.

Uribe RM, Pérez-Martínez L, Covarrubias ML, Gómez B, Covarrubias L, Charli JL, Joseph-Bravo P., 1995. Neural regulation of TRH biosynthesis. *Neurosci Lett* 201: 41-44.

Vargas MA, Cisneros M, Herrera J, Joseph-Bravo P, Charli JL, 1992a. Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord and organs. *Peptides* 13: 255-260.

Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P, 1992b. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohypophysis and pancreas. *Devel Brain Res* 66: 251-256.

Vargas MA, Méndez M, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL, 1994. Thyrotropin releasing-hormone down regulates pyroglutamyl aminopeptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology* 60: 323-330.

Vargas MA, Méndez M, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL, 1987. Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase-degrading TRH in rat brain. *Neurosci Lett* 79:1476-1492.

Vargas MA, Bourdais J, Sánchez S, Uriostegui B, Moreno E, Joseph-Bravo P, Charli JL, 1998. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohipophyseal cells: role of the cAMP pathway. *J. Neuroendocrinol* 10:199-206.

Vijayan E, McCann SM, 1977. Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 100:1727-1730.

Vindrola O, Briones R, Asai M, Fernández Guardiola A., 1981. Amygdala kindling enhances the enkephalin content in the rat brain. *Neurosci Lett* 21: 39-43.

Watanabe Y, Johnson RS, Butler LS, Binder DK, Spiegelman BM, Papaioannou VE, McNamara JO, 1996. Null mutation of *c-fos* impairs structural and functional plasticities in the kindling model of epilepsy. *J Neurosci* 16: 3827-3836.

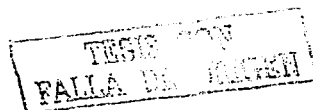
Weiss GK, Castillo N, Fernández M, 1993. Amygdala kindling rate is altered in rats with a deficit in the responsiveness of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Lett.* 157: 91-94.

Wei-Xei C, Lee PHK, Douglass J, Crain B, Hong JS, 1989. Deep prepyriform cortex kindling differentially alters the levels of prodynorphin mRNA in rat hippocampus and striatum. *Brain Res* 495: 156-160.

Wilk S, Suen CS, Wilk EK, 1988. Occurrence of pyroglutamyl peptidase II, a specific TRH degrading enzyme in rabbit retinal membranes and in human retinoblastoma cells. *Neuropeptides* 12: 43-47.

Wilk S, Wilk E, 1989. Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme: Purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem Int* 15: 81-89.

Winokur A, Beckman AL, 1978. Effects of thyrotropin releasing hormone, norepinephrine and acetylcholine on the activity of neurons in the hypothalamus, septum and cerebral cortex of the rat. *Brain Res* 150: 205-209.





Yajima Y, Akita Y, Yamaguchi A, Saito T, 1990.  $Ca^{2+}$ -independent secretory mechanism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) involves protein kinase C in rat pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 173:571-577.

Yamada M, Radovick S, Wondisford RE, Nakayama Y, Weingraub BD, Wilber JF, 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro-thyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 4: 551-556.

Yamamura M, Kinoshita K, Nakagawa H, Ishida R, 1991. Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog (II): Involvement of the DA system in the locomotor stimulating action of TA-0910. *Jpn J Pharmacol* 55: 57-68.

Zoeller RT, Fletcher DL, 1994. A single administration of ethanol simultaneously increases c-fos mRNA and reduces c-jun mRNA in the hypothalamus and hippocampus. *Mol Brain Res* 24: 185-191.

Zoeller RT, Kabeer N, Albers HE, 1990. Cold exposure elevates cellular levels of mRNA encoding TRH in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology* 127: 2955-2962.

Zoeller RT, Rudeen PK, 1992. Ethanol blocks the cold induced increase in thyrotropin-releasing hormone mRNA in paraventricular nuclei but not the cold induced increase in thyrotropin. *Molecular Brain Res* 13: 321-330.

Zoeller RT, Simonyi A, Butnariu O, Fletcher KL, 1995. Effects of acute ethanol administration and cold exposure on the hypothalamic pituitary axis. *Endocrine* 3: 39-47.

Zoeller RT, Wolf RS, Koeller KJ, 1988. Thyroid hormone regulation of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin (TSH)-releasing hormone is independent of the pituitary gland and TSH. *Mol Endocrinol* 2: 248-252.

