



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"LA PARTICIPACION DE LA HORMONA LIBERADORA DE
TIROTROPINA (TRH) EN EL SISTEMA LIMBICO EN UN
MODELO ANIMAL DE DEPRESION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

OLIVIA TANIA HERNANDEZ HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI GALLARDO

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m343027



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA 14
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"La participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH)
en el sistema límbico en un modelo animal de depresión"

realizado por Hernández Hernández Olivia Tania

con número de cuenta 09609876-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Patricia Bertha Jusith de Gortari Gallardo *P. de Gortari G.*

Propietario Dra. Carolina López Rubalcava *CR*

Propietario Dra. Patricia Joseph Bravo *P. Joseph*

Suplente Dra. Erika Konserrat Estrada Camarena *E. Camarena*

Suplente Dr. Ignacio Camacho Arroyo *I. Camacho*

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



**UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA**

Educar no es dar carrera para vivir,
sino temprar el alma para las
dificultades de la vida

Anónimo

No sólo por haber probado del árbol de
la ciencia somos pecadores,
sino también por no haber probado
aún del árbol de la vida

Franz Kafka

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México
por brindarme una formación académica.

Lugar donde he vivido
momentos tan agradables.

Agradecimientos

A mí directora de tesis y a mis sinodales, por ser los cimientos de este trabajo, además por proporcionarme los elementos necesarios para llevar a cabo la parte experimental y por su puesto en lo académico.

Dra. Patricia de Gortari:

La dedicación y el gusto que muestras por la investigación y la docencia es como un imán para acercarse a esta noble profesión. Gracias por la confianza, paciencia y enseñanzas.

Dra. Carolina López, Dra. Patricia Joseph, Dra. Erika Estrada,
Dr. Ignacio Camacho:

El conocer sus trayectorias como excelentes investigadores resulta ser una fuente de motivación para continuar adelante. Gracias por su tiempo y por las sugerencias constructivas.

Dra. Lucía Martínez:

Por brindarme su apoyo y por permitirme conocer la gran persona que es.

Dedicatoria

Guadalupe:

Mamá, gracias esto es el fruto de tu esfuerzo y dedicación, el saber como has llevado tu vida siempre buscando superarte aún cuando se presentan obstáculos es mi inspiración y a la vez la fuerza que me impulsa a avanzar. Gracias porque siempre has estado conmigo, apoyándome y por depositar tu confianza en mí. No hay palabras que expresen en realidad todo lo que representas para mí, ya que te admiro tanto y te quiero infinitamente.

Conchita (mi abuelita):

Por ser el pilar de nuestra familia y mostrar congruencia entre lo que piensa y hace. Gracias por su cariño, por permitirme convivir con usted y aprender de su experiencia de vida (algo que no enseñan en la escuela).

A mis tíos

Martha:

Por mostrarte más bien como una hermana (con todas sus implicaciones que conlleva esto), te agradezco tu tolerancia y buenos consejos.

Jesús:

Gracias por tu generosidad y por las conversaciones tan amenas.

A Frida:

Porque tu presencia hace más alegres nuestras vidas, tus risas y ocurrencias siempre resultan gratas

Octavio:

Eres un ser excepcional, talentoso y encantador, por lo que no es para menos el sentirme afortunada de que estés a mi lado.

Ahora puedo compartir contigo este logro, que me resulta más significativo porque eres parte de esto, ya que con tu ejemplo o tus palabras aumentaba mi anhelo de alcanzar lo que deseaba. Gracias por hacerme participe de tus emociones y vivencias.

Sandra y Aimeé:

Hay tanto que recordar de ustedes.....
pero principalmente quiero agradecerles su sincera amistad y por eso tengan la seguridad de que siempre estarán en mis pensamientos y mi corazón.

Y también a

Libo, Rosa, Ana, Everardo, Marcela, Mariana, Ángel:
Tendrán personalidades muy distintas pero en el fondo tienen virtudes en común, como, la de ser leales a los amigos.

INDICE

RESUMEN	1
----------------------	---

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Hormona liberadora de tiotropina	3
1.2 Biosíntesis del TRH	5
1.3 Regulación de la biosíntesis del TRH	6
1.4 Receptores del TRH	8
1.5 Degradación del TRH	8
1.6 Funciones del TRH	9
1.7 Sistema límbico	10
1.8 Depresión	15
1.9 Neurobiología de la depresión	11
1.10 El TRH y depresión	15
1.11 Modelo animal de depresión	20

II. JUSTIFICACIÓN	23
--------------------------------	----

III. HIPÓTESIS	24
-----------------------------	----

IV. OBJETIVOS	24
----------------------------	----

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales	25
5.2 Grupos experimentales	25
5.3 Prueba de Nado Forzado	26
5.4 Análisis Conductual	26
5.5 Extracción del TRH	27
5.6 Radioinmunoensayo del TRH	27
5.7 Cuantificación de proteína total por el método de Lowry	28
5.8 Radioinmunoensayo de Corticosterona	29
5.9 Radioinmunoensayo de TSH	30
5.10 Análisis Estadísticos	31

VI. RESULTADOS

6.1 Cambios en eje el tiroideo.....	32
6.2 Cambios en el sistema límbico.....	35

VII. DISCUSIÓN

7.1 Cambios en el eje HHT.....	43
--------------------------------	----

7.2 Cambios en el sistema límbico.....	46
VIII. CONCLUSIONES	53
IX. PERSPECTIVAS.....	54
REFERENCIAS.....	55
ANEXOS	

RESUMEN

La Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) es un tripéptido, sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo, controla la secreción de tirotropina (TSH) y de prolactina en la hipófisis anterior y en el Sistema Nervioso Central actúa como neuromodulador, produciendo una amplia gama de efectos conductuales. El TRH puede jugar un papel en el desarrollo y tratamiento de la depresión; mejora los síntomas en un 50% de los pacientes con depresión severa pocas horas después de su administración intratecal; los choques electroconvulsivos inducen la expresión del gen de preproTRH en regiones límbicas por lo que, el TRH se propone como agente terapéutico valioso. El objetivo del presente trabajo fue identificar la participación del TRH del Sistema Límbico de la rata en un modelo de depresión, en el que se considera a la conducta de inmovilidad como índice de depresión. Ratas Wistar macho adultas se dividieron en los siguientes grupos: a) control 1, no se sometieron al nado forzado y sacrificadas el día 1; b) pre-prueba 30 min, forzadas a nadar el día 1 durante 15 min y sacrificadas 30 min después; c) pre-prueba 24 h, forzadas a nadar el día 1 y sacrificadas 24 h después; d) control 2, no se sometieron a la prueba de nado forzado y sacrificadas el día 2; e) prueba 30 min, forzadas a nadar el día 1 y el día 2 durante 15 min y sacrificadas 30 min después. Se registró y analizó la conducta de las ratas durante el nado forzado. Se extrajeron los cerebros y se disecaron en: parte superior del hipotálamo, hipotálamo mediobasal, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo y septum. Se cuantificó por radioinmunoensayo el contenido del TRH, la concentración en suero de TSH y corticosterona. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo en el contenido del TRH en la parte superior del hipotálamo en pre-prueba 24 h; en el hipotálamo mediobasal en pre-prueba 30 min y en la corteza frontal en pre-prueba 30 min. El contenido del TRH disminuyó significativamente en: el hipotálamo mediobasal en prueba 30 min y en el septum en pre-prueba 30 min y prueba 30 min. Por otro lado, aumentó significativamente la concentración sérica de TSH en prueba 30 min y la de corticosterona en pre-prueba 30 min y prueba 30 min. Se obtuvieron correlaciones significativas entre el aumento de corticosterona y disminución en el contenido del TRH en el septum en prueba 30 min; entre el aumento de corticosterona y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad (número de veces que la rata está inmóvil en el tiempo de la prueba); entre el número de cuentas de la conducta de inmovilidad y el aumento en el contenido del TRH de la corteza

frontal en pre-prueba 30 min y entre el número de cuentas de la conducta de inmovilidad y la disminución en el contenido del TRH del septum en prueba 30 min. De esta manera, se concluye que los cambios encontrados en el contenido del TRH en la prueba de nado forzado son tejido específicos y varían con el tiempo, lo que pone en evidencia la activación de las vías TRHérgicas de las regiones previamente mencionadas, en ratas sometidas al modelo de nado forzado de Porsolt y se sugiere que el TRH del Sistema Límbico y del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo (HHT) participa en la conducta de inmovilidad.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)

Los péptidos son importantes componentes reguladores de la función del sistema nervioso (Nillni et al., 1999) y constituyen una gran familia de moléculas involucradas en la comunicación celular en organismos pluricelulares (Joseph-Bravo et al., 1998). La hormona liberadora de tirotropina (TRH) extraída del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo de porcino fue el primer péptido hipofisiotrópico purificado y caracterizado por Boler et al., (1969) y Burgus et al., (1969). Ambos grupos, trabajando independientemente, reportaron que el TRH es un tripéptido con la secuencia de aminoácidos piroglutamil-histidil-prolinamida (pyroGlu-His-Pro-NH₂). La figura 1.1 muestra la estructura química del tripéptido.

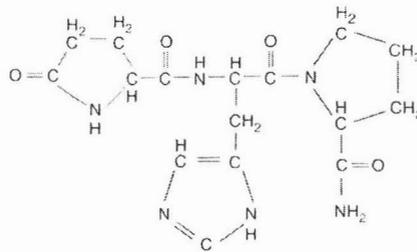


Fig. 1.1 Estructura química de TRH (Tomado de Lechan y Toni, 2000)

El tripéptido no es especie-específico, el TRH de porcino tiene la misma estructura que el TRH de ovino, está activo en todas las especies de mamíferos, incluyendo humanos (Fleischer y Guillemin, 1976).

El TRH es sintetizado principalmente en el NPV, se libera en respuesta a un estímulo fisiológico a través de la eminencia media para controlar la secreción de tirotropina (TSH) [Haisenleder et al., 1992] y de prolactina (PRL) [Grosvenor y Mena, 1980] en la hipófisis anterior (Boler et al., 1969). La función de TRH es central en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HHT, ver fig. 1.2).

Dos terceras partes del total del TRH contenido en el cerebro están localizados fuera del hipotálamo (Winokur y Utiger, 1974), y sus receptores están extensamente distribuidos en todo el sistema nervioso central (SNC), particularmente en altas densidades en regiones límbicas (Manaker et al., 1986). El TRH ha sido encontrado también, en la retina, el tracto gastrointestinal, el páncreas y en tejidos reproductivos como la placenta, ovarios, testículos, vesículas seminales y próstata (Lechan, 1993). En el SNC el TRH actúa como neurotransmisor y neuromodulador, produciendo una amplia gama de efectos conductuales que son independientes de su función hormonal (Plotnikoff et al., 1972; Nemeroff et al., 1978).

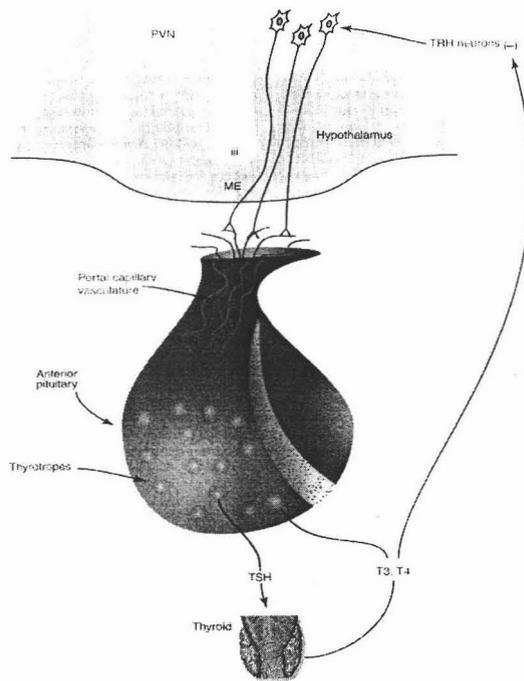


Fig. 1.2 Regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (Zigmond et al., 2003)

1.2 Biosíntesis del TRH

El TRH es sintetizado en el retículo endoplásmico rugoso conforme al mecanismo biosintético de los péptidos clásicos a partir del procesamiento postraduccionnal de una preprohormona. El preproTRH de la rata es una proteína de 255 aminoácidos con un peso molecular de 29247 daltons; posee 5 copias de la secuencia Gln-His-Pro-Gly flanqueadas por pares de aminoácidos básicos, sea Lis-Arg o Arg-Arg (Lechan et al., 1986), mientras que en el humano hay 6 copias de la secuencia que codifica el TRH (Yamada et al., 1990).

El gen del TRH está presente como una sola copia en el genoma de rata, caracterizado por Lee et al., (1988); su estructura se esquematiza en la figura 1.3. El gen del TRH en humano ha sido caracterizado (Yamada et al., 1990), y la homología con el de rata es del 73.3 % y del 89.2 % en la región que codifica para el TRH. La unidad transcripcional de ambos genes contiene 3 exones separados por 2 intrones. La región 5' contiene la secuencia promotora que codifica para varios elementos reguladores: el receptor de la hormona tiroidea (TR), dos unidades sencillas de regiones que unen TR homodimérica como heterodimérica con proteínas auxiliares de TR; un sitio consenso del receptor (GR) de glucocorticoides (GC); y dos elementos imperfectos de respuesta a AMPc (CREs) (Joseph-Bravo et al., 1998). El exón 1 codifica para la región 5' no traducida del RNAm; el exón 2 para el péptido señal y una pequeña porción del péptido amino terminal; el exón 3 codifica para la mayor parte de proTRH (Lee et al., 1988).

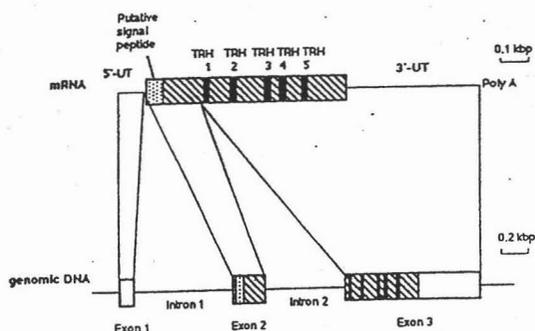


Fig. 1.3 Estructura del gen preproTRH de rata (Lee et al., 1988)

La biosíntesis del TRH y otros derivados peptídicos de proTRH comienza con la traducción ribosomal del RNAm, seguida por la proteólisis postraducciona de un gran precursor proTRH. En los residuos de los pares de aminoácidos básicos actúa la prohormona convertasa 1 (PC1) y prohormona convertasa 2 (PC2) (Nillni et al., 1995), seguida de la acción de la carboxipeptidasa E (CPE) para remover los residuos básicos (Nillni et al., 1997). La secuencia Gln-His-Pro-Gly conocida como TRHGly, se convierte a TRH por la enzima peptidilglicina α amidante monooxigenasa (PAM) (Bruhn et al., 1998), la cual usa el C-terminal Gly como donante de amida y el residuo de Gln es ciclizado a pGlu (Nillni y Sevarino, 1999).

1.3 Regulación de la biosíntesis del TRH

1.3.1 Hormonas tiroideas

La síntesis del TRH en las neuronas del NPV es regulada por retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas. La tiroidectomía o la administración oral de tioaminas en ratas, produce hipotiroidismo y como consecuencia aumenta el RNAm de proTRH en el NPV. Un simultáneo incremento en el proTRH y su RNAm sugieren que el hipotiroidismo induce la transcripción y traducción de proTRH en el NPV (Segerson et al., 1987).

El nivel del RNAm de proTRH no presenta cambios bajo la influencia de las hormonas tiroideas en otras regiones que contienen el TRH, como el núcleo reticularis del tálamo y el bulbo olfatorio (Koller et al., 1987; Segerson et al., 1987), probablemente debido a la distribución diferencial de los receptores de las hormonas tiroideas y/o a que los factores transcripcionales necesarios para la actividad de los receptores de las hormonas tiroideas son tejido-específicos (Hollenberg et al., 1995).

1.3.2 Glucocorticoides

Los glucocorticoides evocan un amplio espectro de respuestas en muchas células eucarióticas para estimular o reprimir la transcripción de genes, incluidos los de las hormonas peptídicas (Beato, 1989).

Los reportes sobre los efectos de glucocorticoides sobre la síntesis del TRH son contradictorios, los niveles del RNAm de TRH son inhibidos por glucocorticoides *in vivo* (Kakucska et al., 1995). Los glucocorticoides inhiben el eje HHT en ratas y en humanos *in vivo*, probablemente por un efecto indirecto en las neuronas TRHérgicas, puesto que los glucocorticoides tienen un efecto opuesto en cultivo de células del hipotálamo, estimulando la expresión del RNAm de TRH (Luo et al., 1995).

1.3.3 Catecolaminas y neuropéptidos

Las neuronas TRHérgicas del NPV están en una posición estratégica en la cual pueden ser reguladas por factores neuroendócrinos. Estas neuronas que contienen TRH están densamente innervadas por axones de neuronas originadas en otras regiones cerebrales (Ricardo y Koh, 1978). Shioda et al., (1986) y Liposits et al., (1987) aportaron evidencia morfológica de la presencia de axones catecolaminérgicos en asociación sináptica con los cuerpos celulares y dendritas de las neuronas TRHérgicas del NPV.

Las neuronas TRHérgicas del NPV son innervadas por axones que contienen epinefrina (E) y norepinefrina (NE) provenientes de la médula y puente que estimulan la secreción del TRH (Lechan y Toni, 2000). Se ha propuesto que la dopamina (DA) tiene un papel inhibitor, probablemente influyendo en la secreción de las terminales axonales que contienen TRH en la eminencia media (Price et al., 1983).

Las neuronas del NPV que contienen TRH también reciben innervaciones de neuronas que liberan el neuropéptido Y (NPY) originadas en el núcleo arcuato del hipotálamo y en menor cantidad por terminales de somatostatina (SRIF) y péptidos opiodes endógenos provenientes del núcleo arcuato y amígdala. Estas señales neuroendócrinas pueden afectar *in vivo* los niveles del RNAm de preproTRH y el proceso postraducional de proTRH en el NPV (Toni y Lechan, 1993).

Fuera del hipotálamo el TRH está colocalizado con la sustancia P (SP) en la médula espinal y con serotonina (5HT) en el núcleo de raphé. La regulación de estos sistemas neurales no ha sido bien caracterizada (Hokfelt et al., 1989). Otros mediadores incluyendo

el ácido gama aminobutírico (GABA) y las citocinas regular la secreción del TRH en la eminencia media (Toni y Lechan, 1993).

1.4 Receptores del TRH

Burt y Snyder (1975) fueron los primeros en demostrar la unión de un receptor con el TRH tritiado en membranas de tejido cerebral de rata. El receptor tipo 1 del TRH (TRH-R1) ha sido clonado en ratón (Straub et al., 1990), en rata (De La Pena et al., 1992) y en humano (Matre et al., 1992). Cao et al., (1998) e Itadani et al., (1998) han clonado el receptor tipo 2 del TRH (TRH-R2) en rata. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G.

El TRH-R1 se encuentra en altas concentraciones en la adenohipófisis y predomina en regiones límbicas como la amígdala, la corteza perirhinal, la corteza entorhinal, el giro dentado y el núcleo accumbens, áreas asociadas con la regulación del estado de ánimo. La expresión del TRH-R1 en varios núcleos del tallo cerebral y motoneuronas de la médula espinal parece estar relacionado con los efectos descritos del TRH en el sistema autónomo y somatomotor (Heuer et al., 2000).

El TRH-R2 está altamente expresado en regiones cerebrales involucradas en la regulación de la atención, el aprendizaje, el despertar, el sueño, el control motor y procesamiento de la información sensorial como hipotálamo, tálamo, hipocampo y corteza (Heuer et al., 2000).

1.5 Degradación del TRH

El TRH es resistente a varias enzimas proteolíticas y a la acción de muchas enzimas inespecíficas como la pepsina, papaína o termolisina (Burgus y Guillemin, 1970). Se ha caracterizado una ectopeptidasa específica para el TRH, la piroglutamil peptidasa II (PPII) que lo hidroliza en la unión de pyroGlu-His (Bauer, 1995).

La PP II fue purificada de las membranas sinaptosomales del cerebro del conejillo de Indias y muestra un alto grado de especificidad con un K_m de 40 μ M para TRH (O' Connor y O' Cuinn, 1984). El sitio activo de PP II se encuentra orientado hacia el espacio extracelular, donde entra en contacto con el TRH, sólo cuando es liberado (Charli et al., 1988). Por eso, PP II se considera como el mecanismo fisiológico de degradación del TRH (Garat et al., 1985). La PP II es una metaloenzima de 230 KDa, que remueve el residuo pGlu del TRH (Czekay y Bauer, 1993). La localización de la PP II en el SNC coincide con los sitios cercanos a la liberación del TRH (Vargas et al., 1992). La degradación del TRH en suero es a través de la enzima llamada tiroliberinasa (Taylor y Dixon, 1978), que presenta las mismas propiedades bioquímicas de la PPII (Bauer et al., 1981).

1.6 Funciones del TRH

Es claro que las funciones biológicas del TRH se extienden más allá de la regulación del eje tiroideo. Consistente con su amplia distribución en áreas límbicas del cerebro, por ejemplo la amígdala, el núcleo accumbens y el hipocampo (Kubek y Sattin, 1984; Sattin et al., 1987; Kubek et al., 1993) se ha sugerido que tiene un papel de neuromodulador y efectos farmacológicos relacionados con la regulación del despertar, funciones autónomas, termoregulación, revierte el efecto de sedación provocado por narcóticos o el alcohol, aumenta la actividad locomotora, regulación del ritmo cardiaco, respiratorio y motilidad gástrica, y efectos anoréxicos, antidepresivos y antiepilépticos (O' Leary y O' Connor, 1995; Gary et al., 2003).

Por ejemplo el TRH administrado sistémica y centralmente aumenta el tiempo de vigilia en varias especies (Arnold et al., 1991; Nishino et al., 1997); incrementa la temperatura del cuerpo cuando es inyectado en la región preóptica y disminuye los efectos hipotérmicos que provocan el pentobarbital y el etanol (Strand, 1999). El TRH aumenta la actividad colinérgica en los sistemas septo-hipocampal y en el núcleo basalis-cortical (Kalivas et al., 1981; Giovannini et al., 1991), vías que juegan un papel central en revertir la narcosis inducida por drogas (Brunello y Cheney, 1981). El TRH mejora los déficits en aprendizaje y/o memoria en ratas con deficiencias cognitivas inducidas por tratamientos

anticolinérgicos, choques electroquímicos o lesiones quirúrgicas (Horita et al., 1989; Ballard et al., 1996); provoca la activación locomotora cuando es inyectado en el núcleo accumbens (Miyamoto y Nagawa, 1977; Sharp et al., 1984), en el área tegmental ventral, en el caudado (Kalivas et al., 1987), en el núcleo septal (Sharp et al., 1984) y en el hipotálamo ventromedial (Shian et al., 1985). La inyección de TRH en el hipotálamo ventromedial, al igual que la administración subcutánea inhibe la ingesta de alimento y agua (Suzuki et al., 1982; Choi et al., 2002). Por otro lado, estudios tempranos reportan que la administración intravenosa de TRH produce una rápida, pero transitoria, mejoría de la depresión (Kastin et al., 1972; Prange et al., 1972).

El TRH también se ha encontrado activo en una prueba de conflicto que involucra la respuesta a un castigo (Vogel et al., 1980) un paradigma usado para examinar compuestos con eficacia clínica en ansiedad. Cambios en el metabolismo del TRH han sido implicados en fisiopatologías como la esquizofrenia (Nemeroff et al., 1984), la epilepsia (Renning et al., 1992), la enfermedad de Alzheimer (Albert et al., 1993) y la esclerosis lateral amiotrófica (Griffiths, 1986).

1.7 Sistema límbico

Los componentes de una vía colectivamente constituyen un sistema. El término sistema límbico es asignado a la colección de estructuras con extensas interconexiones que parecen estar involucradas en varias funciones complejas, formando la experiencia emocional. El término deriva del concepto de “lóbulo límbico”, propuesto en 1878 por el neurólogo francés Paul Broca. Él reconoció un conjunto de estructuras que forman un círculo o borde alrededor del tallo cerebral, las cuáles incluyen el giro cingulado, el giro parahipocampal y la corteza olfatoria. La figura 1.6 esquematiza estas áreas (Bear et al., 1996; Oswald, 2000).

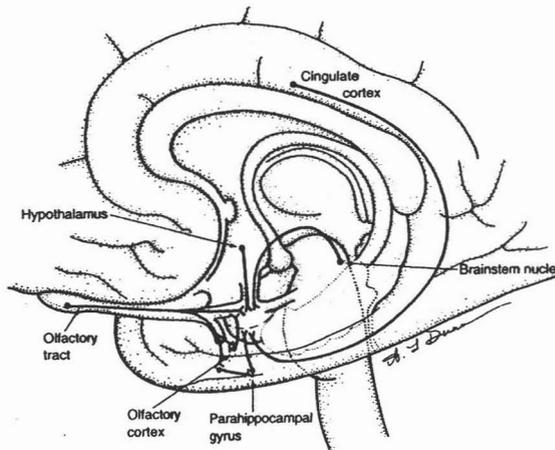


Fig. 1.4 Broca nombró lóbulo límbico al conjunto de estructuras que rodean al tallo cerebral (Oswald, 2000).

Un número de estructuras límbicas están involucradas en la emoción. En 1937 Kluver y Bucy reportaron que daños en estructuras del lóbulo temporal (especialmente en la amígdala) producen alteraciones en las respuestas emocionales, conductas sociales anormales e hipersexualidad. En ese mismo año James Papez definió un circuito que involucra interconexiones entre el hipocampo, amígdala, septum, cuerpos mamilares, bulbo olfatorio y corteza (ver figura 1.7). Papez, propuso que estos circuitos juegan un papel importante en el control de la conducta emocional ya que encontró que los tumores localizados cerca de la corteza cíngulada estaban asociados con trastornos emocionales incluyendo miedo, irritabilidad y depresión (Bear et al., 1996; Oswald, 2000).

El término sistema límbico fue popularizado en 1952 por el fisiólogo Paul MacLean, quien argumentó que las estructuras límbicas forman una de las tres divisiones funcionales primarias del cerebro. Estas tres divisiones, según la teoría de MacLean, son el cerebro reptiliano, el viejo y el nuevo cerebro de mamífero. De acuerdo con esta teoría la evolución de un sistema límbico (del viejo cerebro de mamífero) permitió a los animales experimentar y expresar emociones, además de emanciparlos de las conductas estereotipadas dictadas por su tallo cerebral [cerebro reptiliano] (Bear et al., 1996; Oswald, 2000).

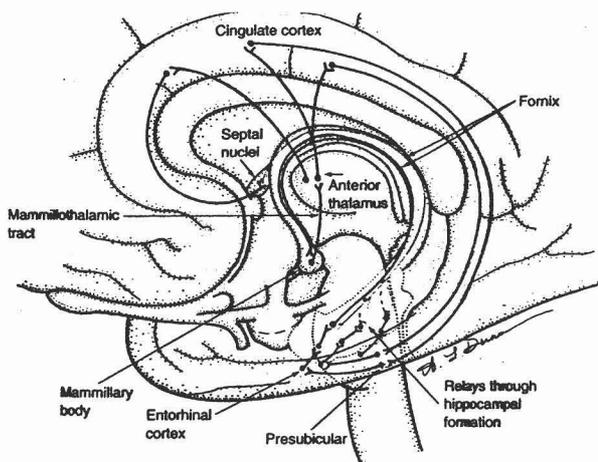


Fig. 1.5 Circuito de Papez (Oswald, 2000).

1.7.1 Hipotálamo

El hipotálamo media los síntomas neurovegetativos, como son el sueño, el apetito, la energía, la libido. Una de sus características fundamentales es su papel de coordinador de las distintas funciones neuroendócrinas y neurovegetativas que se alteran en la depresión, como hiperactividad del eje HHA e hipotiroidismo (Dinan, 2001). En algunos estudios de pacientes con depresión mayor se encontraron alteraciones morfométricas del hipotálamo, mostrando una disminución en su volumen (Drevets et al., 1999).

1.7.2 Núcleo accumbens

Mogenson et al., (1980) propusieron que el núcleo accumbens sirve como interfase, al convertir señales motivacionales provenientes de la corteza límbica en acciones o movimientos. El núcleo accumbens está involucrado en los mecanismos de recompensa del consumo de drogas, asimismo, en la regulación del estado de ánimo (Dinan, 2001). En él se encuentran neuronas dopaminérgicas del sistema dopaminérgico mesolímbico, que se activan durante situaciones o estímulos ambientales particulares, por ejemplo, el estrés o el consumo de drogas (Leung et al., 2000).

Estudios anatómicos muestran que el núcleo accumbens recibe innervaciones sinápticas de la corteza prefrontal, hipocampo y amígdala basolateral (Goto y O'Donell, 2002). Se ha reportado que tratamientos antidepresivos aumentan la neurotransmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens (Duman, 1999).

1.7.3 *Corteza frontal*

Los estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) y de resonancia magnética funcional (RMF) han mostrado una posible alteración anatómica en la corteza frontal en casos de depresión unipolar y bipolar familiar. Esta región tiene extensas conexiones con otras áreas que participan en la conducta emocional, como el núcleo amigdalino, el hipotálamo, el núcleo accumbens y los sistemas noradrenérgico, serotoninérgico y dopaminérgico del tallo cerebral (Kandel et al., 2001).

Los pacientes con lesiones en la corteza frontal presentan alteraciones en la respuesta autonómica a estímulos emocionales (Damasio et al., 1990). También se ha encontrado que el metabolismo de la glucosa y el flujo sanguíneo de la corteza están alterados en la depresión unipolar y bipolar (Drevets et al., 1992).

1.7.4 *Amígdala*

La amígdala parece jugar un papel en la asignación del significado afectivo de los estímulos fisiológicos y sensoriales (Duman, 1999). Además condiciona de forma fundamental la respuesta a estímulos temerosos y agradables, es decir elabora la memoria emocional (Dinan, 2001).

La amígdala está implicada en la acción farmacológica de los tratamientos antidepresivos (Gorka et al., 1979; Duncan et al., 1986). También se ha observado un incremento anormal del flujo sanguíneo vascular y del metabolismo de la glucosa en pacientes con trastorno depresivo familiar y bipolar en la amígdala (Drevets et al., 1992; 1995).

1.7.5 *Hipocampo*

El hipocampo está involucrado en el control de la emoción, aprendizaje, memoria y regulación del eje HHA, así como también en otros procesos vegetativos. Cambios en la estructura o función de las neuronas del hipocampo podrían resultar en anormalidades afectivas, neuroendócrinas, cognitivas y vegetativas (Duman et al., 1997). Animales expuestos al estrés físico o psicosocial crónico presentan atrofia en las neuronas piramidales CA3 del hipocampo (Magarinos et al., 1999). Daño en el hipocampo conlleva a una reducción de la retroalimentación negativa sobre el eje HHA, manteniendo elevada la actividad glucocorticoidea y causando un mayor daño hipocampal. Estudios de imagen cerebral demuestran que el volumen del hipocampo está reducido en pacientes con depresión o trastorno post-traumático (Bremmer et al., 1995).

1.7.6 *Eminencia media (o hipotálamo mediobasal)*

El tratamiento crónico con drogas antidepressivas (amitriptilina y clorimipramine) provoca un ligero aumento en el contenido del TRH en la eminencia media (Lighton et al., 1985).

1.7.7 *Septum*

El núcleo del septum lateral está involucrado en la regulación de la ansiedad y la depresión experimental (Contreras et al., 1995). Se ha reportado que ratas sometidas a la prueba de nado forzado presentan una reducción (aproximadamente del 50%) en la velocidad de disparo de las neuronas del septum lateral (Contreras et al., 2004). La conducta de inmovilidad es revertida por la administración sistémica de antidepressivos en el núcleo del septum lateral de ratas sometidas a la prueba de nado forzado (Estrada-Camarena et al., 2002).

Ishikawa et al., (1986) indicaron que neuronas TRHérgicas del hipotálamo lateral, grupo perifornical y área preóptica lateral proyectan hacia el septum lateral. Las innervaciones al núcleo septal derivan del hipocampo, amígdala y corteza cingulada (Oswald, 2000).

1.8 Depresión

El Manual Estadístico y Diagnóstico 4ª edición (DSM-IV, 1998) describe que la depresión es una alteración del estado de ánimo que se caracteriza por la presencia de sentimientos de tristeza, desesperanza, falta de valor, culpa y desesperación. Frecuentemente los pacientes presentan pérdida de apetito, insomnio o hipersomnio, disminución del deseo sexual, fatiga y retardo motriz o agitación. Entre los síntomas físicos pueden incluirse problemas digestivos y dificultad para respirar. La depresión severa puede ser extremadamente debilitante y puede terminar en suicidio.

De acuerdo al DSM-IV, la depresión se puede clasificar de la siguiente forma:

- 1) La depresión reactiva: se presenta en respuesta a un factor medio ambiental como la pérdida de un ser querido o por el estrés.
- 2) La depresión endógena: en la que no se reconoce una causa aparente en el medio ambiente.
- 3) La depresión asociada a alguna enfermedad (por ejemplo hipotiroidismo) o bien, como consecuencia del consumo de un medicamento.

En un episodio depresivo, los síntomas permanecen por al menos 2 meses y en un trastorno depresivo, los síntomas duran por un periodo de tiempo mucho más prolongado (DSM-IV, 1998).

Conforme al DSM-IV, los trastornos depresivos se clasifican en:

- 1) Trastorno depresivo mayor: se presentan al menos 5 de los síntomas mencionados con anterioridad durante al menos 2 semanas, sin manifestar un episodio de manía o un episodio mixto.
- 2) Trastorno distímico: presencia de humor crónicamente deprimido la mayor parte del día durante al menos 2 años.
- 3) Trastorno depresivo no especificado: incluye los trastornos que no alcanzan los criterios de depresión mayor, de distimia o de trastorno de ajuste con depresión y ansiedad.

Los trastornos depresivos anteriores son considerados como unipolares, pero cuando se presentan episodios de manía (estado de ánimo elevado, lo que a menudo se presenta como sentimientos de excesiva confianza, de poder, de energía y creatividad) alternados con episodios de depresión se considera como trastorno bipolar. La prevalencia de los síntomas depresivos es determinada por medio de pruebas psicológicas como la escala de grado Hamilton (Hamilton, 1960) y pueden ser agrupados en dos categorías: unos relacionados con la cognición y otros asociados a las funciones somáticas.

La depresión se ha convertido en uno de los trastornos mentales más frecuentes entre la población de diferentes países y ha sido reconocida como un problema de salud pública (Blazer et al., 1994). La depresión ocupa en la actualidad el cuarto lugar entre las enfermedades más discapacitantes y estimándose que para el año 2020 será la segunda causa de morbilidad (Caraveo-Arduaga et al., 1999). La prevalencia de episodios depresivos en diferentes países varía de 2.6% a 5.5% en los hombres y de 6.0% al 11.8% en las mujeres (Lehtinen y Joukama, 1994).

1.9 Neurobiología de la depresión

La depresión es un trastorno afectivo heterogéneo, los niveles implicados van desde las alteraciones moleculares, desregulación de la neurotransmisión, neuroendocrinológica y neuroinmune, hasta las manifestaciones afectivas, cognitivas y conductuales de la enfermedad (Duman et al., 1997; Manji y Lenox, 2000). Se están empezando a describir alteraciones en el funcionamiento de algunas proteínas, que determinan los mecanismos celulares y que producen alteraciones en el neurotrofismo y la neuroplasticidad de determinadas poblaciones celulares, tanto neuronales como gliales (Duman et al., 1997; Altar, 1999). El esquema de la figura 1.4 refleja de manera gráfica uno de los modelos fisiopatológicos de la depresión.

En la depresión se cree que están involucradas múltiples áreas cerebrales que se interrelacionan entre sí produciendo los síntomas de la enfermedad como son: la corteza

prefrontal, el tálamo, el núcleo caudado, el núcleo accumbens, el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala (Drevets et al., 1999).

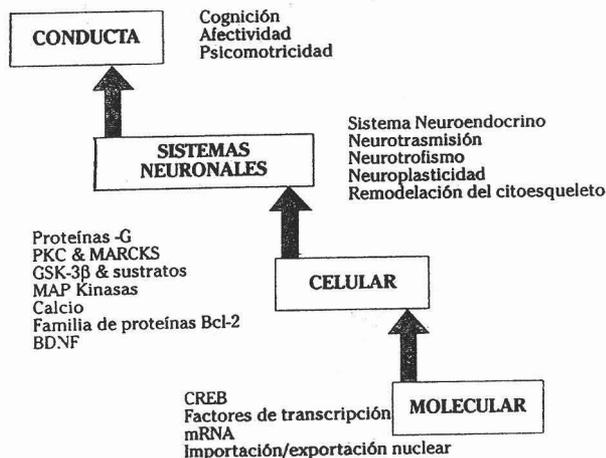


Fig. 1.6 Modelo fisiopatológico (tomado de Zandio et al., 2002).

Estudios preclínicos y clínicos indican que la 5-HT y NE están involucradas en la fisiopatología y tratamiento de la depresión. Estudios clínicos demostraron que el tratamiento con reserpina interfiere con la acumulación de monoaminas y por lo tanto, la disminución de sus niveles pueden causar depresión en algunos individuos. Esto lleva a la hipótesis de que la depresión resulta de la reducida disponibilidad de 5-HT y/o NE (Schildkraut, 1965; Bunney y Davis, 1965; Coppen, 1967). Esta hipótesis fue apoyada por el descubrimiento de drogas antidepressivas: los tricíclicos y los inhibidores de la monoamina oxidasa (MAO) que incrementan los niveles de monoaminas en la sinapsis (Duman, 1999).

Las vías de transducción de señal intracelular que pueden intervenir en la depresión, están divididas dentro de dos grandes categorías. La primer categoría incluye las vías que son controladas por un receptor acoplado a segundos mensajeros (por ejemplo, adenosín 3', 5'-monofosfato cíclico [AMPC], inositol trifosfato [IP₃], Ca²⁺ y óxido nítrico) y son

usualmente reguladas por neurotransmisores clásicos, aminoácidos y neuropéptidos; como la cascada del AMPc que es regulada por 5-HT y NE. La segunda categoría incluye las vías que son controladas por receptores que contienen o interactúan con, proteína-tirosina cinasa y son usualmente reguladas por factores neurotróficos y citocinas; por ejemplo una de las vías activadas por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) es la cascada de la proteína activada de mitogen (MAP) cinasa. Estas vías controlan todos los aspectos de las funciones neuronales y en última instancia apoyan la capacidad del cerebro a adaptarse y responder a estímulos farmacológicos y ambientales (Duman, 1999).

Otra de las hipótesis actuales de la depresión se basa en lo que denominan “plasticidad neuronal”, que representaría la capacidad que tienen las células cerebrales para adaptarse a las distintas situaciones, reflejando la interacción del sujeto con el medio ambiente como fenómenos de génesis y muerte neuronal. Constituye un mecanismo necesario de adaptación de señales intracelulares (Gage, 2000). Así fallas en la plasticidad neuronal pueden contribuir a generar enfermedades neurodegenerativas. Las estructuras límbicas son las zonas cerebrales que se han implicado en este proceso y coinciden con las detectadas en técnicas de neuroimagen como el hipocampo en el humano (Nestler et al., 2002). Mediante mecanismos intracelulares, diversas situaciones o sustancias (como glucocorticoides y aminoácidos excitadores) originarían una pérdida de plasticidad neuronal y descenso en las funciones neurotróficas (Gage, 2000). El modelo de plasticidad neuronal une la vía de los factores de crecimiento y de los segundos mensajeros con los efectos atróficos de los glucocorticoides en poblaciones neuronales (Duman et al., 1997; Brown et al., 1999; Nestler et al., 2002).

En pacientes con enfermedades endocrinas (tiroideas) se ha observado una alta prevalencia de trastornos de estado de ánimo y en particular con depresión mayor (Esposito et al., 1997). La incidencia de síntomas depresivos en personas que sufren de hipotiroidismo es cerca de 50% mientras que con hipertiroidismo es del 28% (Boswell et al., 1997). Las anomalías del eje HHT en pacientes depresivos son: elevada concentración de T₄, alteraciones en la respuesta de TSH a TRH, presencia de anticuerpos antitiroideos y elevada concentración de TRH en el líquido cefalorraquídeo (Bahls y

Carvalho, 2004). El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) es fundamental en la respuesta al estrés, pacientes con depresión mayor exhiben un incremento de la actividad del eje HHA, como un aumento en la secreción de cortisol. El efecto de los glucocorticoides consiste en la regulación del metabolismo general y del comportamiento afectivo por medio de su acción directa en numerosas regiones cerebrales, por ejemplo el hipocampo e hipotálamo (Carpenter y Bunney, 1971).

Estudios epidemiológicos reflejan que el 40-50% del riesgo de padecer un trastorno depresivo es de origen genético, por lo que se debe considerar a la depresión como una enfermedad con alto componente hereditario. Pero hasta la fecha la búsqueda de los genes específicos no ha sido exitosa. También se ha involucrado el papel etiológico de los factores no-genéticos como el estrés, los traumas emocionales o las infecciones virales (Nestler et al., 2002).

Existe una variedad de tratamientos y estrategias disponibles para tratar la depresión, cada uno de estos tiene limitaciones en términos de costos, latencia o duración de respuesta, efectos indirectos y porcentaje de respuesta (Huxley et al., 2000).

1.10 El TRH y depresión

Varios estudios sugieren que el TRH puede jugar un papel en el desarrollo y tratamiento de la depresión. La administración intravenosa del TRH como tratamiento de la depresión obtuvo resultados positivos (Kastin et al., 1972; Prange et al., 1972), aunque estos resultados no fueron reproducidos al administrar TRH por vía oral e intravenosa (Coppen et al., 1974; Ehrensing et al., 1974; Hollister et al., 1974). Posiblemente se deba al hecho de que el TRH tiene una mínima penetración en la barrera hematoencefálica (Metcalf et al., 1981; Brooks et al., 1988) y es rápidamente degradada en la periferia [su vida media en suero es de aproximadamente cinco minutos] (Bassiri y Utiger, 1973). Otros estudios señalan que administración intratecal del TRH mejora los síntomas en un 50% de los pacientes con depresión severa (Callahan et al., 1997; Marangell et al., 1997).

Se ha encontrado en pacientes con depresión mayor una disminución en la respuesta de TSH al TRH administrado vía intravenosa (Loosen, 1985). El TRH se ha encontrado elevado en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con depresión mayor (Banki et al., 1988). Post y Weiss (1992) han sugerido que tales incrementos en el TRH pueden representar una adaptación homeostática o compensatoria a los estados depresivos antes de un proceso fisiopatológico primario.

Análogos del TRH, como la EEP (pGlu-Glu-Pro-NH₂) tienen efectos analépticos, eufóricos, antiamnésicos y antidepressivos; su administración intraperitoneal produce una disminución en la conducta de inmovilidad de ratas sometidas a la prueba de nado forzado (Lloyd et al., 2001). El litio es empleado como tratamiento en la depresión, incrementa los niveles de unión de los receptores del TRH en el núcleo accumbens y la amígdala, aumenta la concentración del TRH en la corteza piriforme y el estriado (que puede deberse al incremento de su biosíntesis y/o disminución de la liberación) y reduce el contenido del TRH en el núcleo accumbens, la corteza entorhinal, cingulada anterior, el septum y el cerebelo lateral (Sattin et al., 2002). Los choques electroconvulsivos usados como tratamiento en la depresión severa inducen la expresión del gen de preproTRH en regiones límbicas y extralímbicas, lo que contribuye a la acumulación de evidencia de que estos péptidos son mediadores del efecto antidepressivo de la terapia electroconvulsiva (Pekary et al., 2000, Sattin et al., 1994; Sattin, 1999).

1.11 Modelo animal de depresión

Los modelos animales de depresión son usados por varios propósitos: como una forma de descubrir drogas con propiedades antidepressivas, para investigar aspectos de la neurobiología de la depresión y para el estudio de los mecanismos de acción de las drogas antidepressivas (McKinney, 1984; Willner, 1984; Jesberger y Richardson, 1985; Henn y McKinney, 1987; Willner, 1990).

Se han establecido tres criterios para validar los modelos animales de depresión: 1) validez predictiva, implica que todas aquellas manipulaciones que modifican el estado

patológico en los humanos también deben hacerlo en el modelo animal y se determina por la respuesta a los tratamientos farmacológicos; 2) validez de apariencia, se refiere a la semejanza fenomenológica entre el modelo y el trastorno modelado; 3) validez hipotética, hace referencia a las bases teóricas subyacentes al trastorno psiquiátrico y establece las hipótesis que explican las causas del trastorno psiquiátrico (Willner, 1984; 1986; 1991a).

En los intentos de analizar la acción de antidepresivos y de predecir nuevos componentes con actividad antidepresiva, Porsolt et al., (1977a, b, 1978) reportaron un nuevo modelo conductual en ratas. La prueba está basada en la observación de la conducta de las ratas cuando son forzadas a nadar en un espacio restringido del cuál no pueden escapar; después de un periodo inicial de actividad vigorosa, eventualmente desisten de sus intentos de escapar y permanecen inmóviles, realizando sólo aquellos movimientos necesarios para mantener su cabeza sobre el agua esta conducta se define como conducta de inmovilidad (ver fig. 1.5), la cual refleja un estado de ánimo bajo o desesperanza porque el animal ha aprendido que el escape es imposible. La conducta de inmovilidad es reducida por una variedad de agentes terapéuticamente efectivos en depresión como lo tricíclicos, los inhibidores de la monoamina oxidasa y por tratamientos no farmacológicos como los choques electroconvulsivos, la privación del sueño REM y la exposición a un medio enriquecido (un lugar acondicionado con una variedad de objetos estimulantes para las ratas como son los rollos de papel, una rueda para correr y madera, además con acceso a una dieta variada). La prueba de nado forzado es sensitiva y específica ya que discrimina el efecto de los antidepresivos de la acción de los neurolépticos y ansiolíticos.

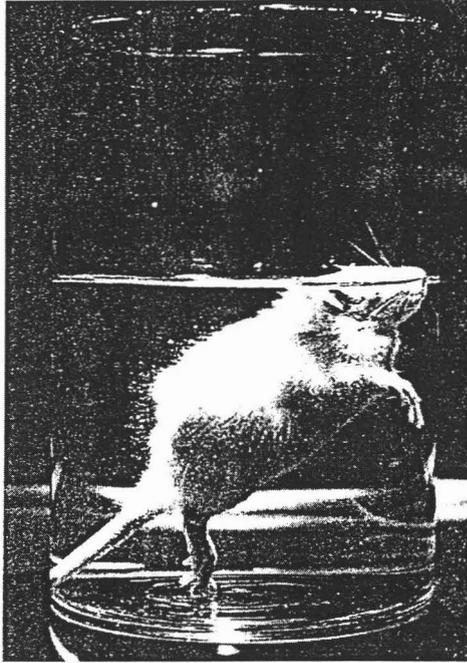


Fig. 1.7 Rata en la típica postura de inmovilidad después de varios minutos de inmersión en el agua.

II. JUSTIFICACIÓN

La depresión es un problema de salud pública, el estrés psicosocial que en muchos casos conlleva a la depresión afecta principalmente a la población en edad productiva (edad promedio de inicio de este tipo de trastorno es de 31 años en México; Caraveo-Anduaga, 1999) y con responsabilidades familiares. Generalmente las personas deprimidas pierden el interés por realizar sus actividades cotidianas, repercutiendo en el ámbito económico, académico, familiar y social.

El TRH participa como neuromodulador en el SNC ya que modula y normaliza efectos fisiológicos y conductuales en animales y humanos. Muchos de estos efectos pueden originarse de la actividad de los sistemas TRHérgicos localizados en áreas límbicas. Se han relacionado cambios en el metabolismo del TRH con los trastornos de ansiedad (Jaworska-Feil et al., 1997), anorexia nervosa (Vijayan y McCann, 1977), epilepsia (Kubek y Garg, 2002) y depresión (Marangell et al., 1997), por estos motivos, se propone al TRH como un agente terapéutico valioso.

La conducta de inmovilidad inducida por la prueba de nado forzado de Porsolt, puede ser reducida con compuestos antidepressivos efectivos clínicamente, se ha reportado que la administración de análogos del TRH (en particular pglu-glu-pro-NH₂) disminuyen el tiempo de inmovilidad en animales que pasan por el nado forzado (Lloyd et al., 2001). Además, después de una serie de choques electroconvulsivos, el contenido del TRH y TRHgly en algunas regiones límbicas ha correlacionado con un incremento en el nado de animales sometidos al modelo de depresión (Sattin et al., 1994). Las inyecciones de TRH en pacientes con depresión reducen los síntomas del trastorno (Marangell et al., 1997).

Aunque se ha propuesto que el TRH está involucrado en la depresión no existen reportes de cuantificación del TRH endógeno en regiones del sistema límbico de ratas sometidas al nado forzado. Así este estudio permitirá identificar si ocurren cambios en el contenido del TRH de regiones límbicas relacionadas con la depresión, después de la

prueba de nado forzado y asimismo, evidenciar si los cambios en el contenido del TRH están involucrados con la conducta mostrada por los animales sometidos al nado forzado.

III. HIPÓTESIS

Los cambios en el contenido del TRH indicarán que las vías TRHérgicas participan en la conducta relacionada con la depresión (inducida por el modelo de nado forzado), esto será definido al encontrar una correlación entre la concentración del TRH de una o más regiones límbicas que se han involucrado en la depresión y el número de cuentas de inmovilidad de los animales.

Si existe una correlación entre los cambios en la concentración de corticosterona y del contenido del TRH, entonces los cambios del TRH podrían deberse al estrés.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es: identificar la participación del TRH en la conducta de inmovilidad, como una medida de depresión, en el sistema límbico de la rata utilizando un modelo animal.

En tanto los objetivos particulares son los siguientes:

- 1) Comparar los cambios en el contenido del TRH de las regiones cerebrales del sistema límbico entre animales sometidos al nado forzado *versus* animales control.
- 2) Relacionar la concentración del TRH de las regiones límbicas con la conducta de inmovilidad en animales sometidos al nado forzado.
- 3) Relacionar la concentración de corticosterona sérica con los cambios en el contenido del TRH en las áreas estudiadas.

prueba de nado forzado y asimismo, evidenciar si los cambios en el contenido del TRH están involucrados con la conducta mostrada por los animales sometidos al nado forzado.

III. HIPÓTESIS

Los cambios en el contenido del TRH indicarán que las vías TRHérgicas participan en la conducta relacionada con la depresión (inducida por el modelo de nado forzado), esto será definido al encontrar una correlación entre la concentración del TRH de una o más regiones límbicas que se han involucrado en la depresión y el número de cuentas de inmovilidad de los animales.

Si existe una correlación entre los cambios en la concentración de corticosterona y del contenido del TRH, entonces los cambios del TRH podrían deberse al estrés.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es: identificar la participación del TRH en la conducta de inmovilidad, como una medida de depresión, en el sistema límbico de la rata utilizando un modelo animal.

En tanto los objetivos particulares son los siguientes:

- 1) Comparar los cambios en el contenido del TRH de las regiones cerebrales del sistema límbico entre animales sometidos al nado forzado *versus* animales control.
- 2) Relacionar la concentración del TRH de las regiones límbicas con la conducta de inmovilidad en animales sometidos al nado forzado.
- 3) Relacionar la concentración de corticosterona sérica con los cambios en el contenido del TRH en las áreas estudiadas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Ratas Wistar macho adultas con un peso de 200-250 g se mantuvieron en grupos de diez por caja, con ciclos de luz-oscuridad invertidos (luz de 22:00-10:00 h), con temperatura controlada (22° C), con acceso *ad libitum* a comida y agua, en el bioterio del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Sur.

5.2 Grupos experimentales

Se formaron cinco grupos de diez ratas:

- 1) Control 1: ratas que no se sometieron al nado forzado y sacrificadas al mismo tiempo que el grupo experimental del día 1 (pre-prueba 30 min).
- 2) Pre-prueba 30 min: ratas forzadas a nadar el día 1 durante 15 min y sacrificadas 30 min después.
- 3) Pre-prueba 24 h: ratas forzadas a nadar el día 1 y sacrificadas 24 h después.
- 4) Control 2: ratas que no se sometieron a la prueba de nado forzado y sacrificadas al mismo tiempo que el grupo experimental del día 2 (prueba).
- 5) Prueba 30 min: ratas forzadas a nadar el día 1 y día 2 durante 15 min y sacrificadas 30 min después.

La prueba de nado forzado el día 1 y 2 se realizaron entre las 8:30 y 11:00 h.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, los cerebros se extrajeron y se congelaron a -70° C en un ultracongelador (Termo Forma ultra freezer) para su posterior disección y análisis, se colectó la sangre y una vez coagulada se centrifugó a 3000 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min (Eppendorf Centrifuge 5810 R) se tomaron alícuotas del suero centrifugado para cuantificar TSH y corticosterona por radioinmunoensayo y se guardaron a -70° C.

Se revisó el atlas Palkovits (Palkovits y Brownstein, 1988) para realizar los cortes y diseccionar el lado izquierdo y derecho de las siguientes regiones cerebrales: parte superior del hipotálamo (sin cuerpos mamilares ni área preóptica), núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo, septum e hipotálamo mediobasal (completo). Durante este procedimiento se utilizó hielo seco para mantener congelados los cerebros y las regiones, éstas fueron colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml que después se almacenaron a -70°C para posteriormente extraer y cuantificar el TRH por radioinmunoensayo.

5.3 Prueba de Nado Forzado

Las ratas fueron individualmente forzadas a nadar durante 15 minutos dentro de un cilindro vertical de plexividrio (40 cm de altura y 18 cm de diámetro) conteniendo 30 cm de agua, aproximadamente a 24°C . Solamente un grupo de ratas (prueba 30 min) se sometió al nado forzado por segunda ocasión 24 h después de la pre-prueba (día 1) durante 15 minutos. Al finalizar la sesión de nado las ratas fueron removidas del cilindro y secadas; por 20 minutos se mantuvieron bajo temperatura controlada a 32°C , se regresaron a sus cajas hasta el sacrificio.

Las conductas de los animales durante la pre-prueba y prueba de nado forzado se registró con una videogradora (Sony) para posteriormente analizar las conductas de nado, escalamiento e inmovilidad.

5.4 Análisis Conductual

Se registró a intervalos de cinco segundos, la conducta realizada por el animal en ese instante, que podía ser una de las siguientes tres categorías:

- 1) Inmovilidad: flotando en el agua, sin hacer esfuerzos, realizando sólo aquellos movimientos necesarios para mantener la cabeza sobre el agua, considerada la conducta relacionada con desesperanza y depresión.
- 2) Nado: realizando movimientos suaves, más que los necesarios para simplemente mantener la cabeza sobre el agua, por ejemplo movimientos alrededor del cilindro o de buceo.

3) Escalamiento: realizando movimientos vigorosos con las patas delanteras dentro y fuera del agua, usualmente dirigidas directamente contra las paredes del cilindro.

De esta forma, al final se obtuvieron un total de 60 cuentas (o veces) repartidas en las tres conductas evaluadas.

5.5 Extracción del TRH

Los lados izquierdos de cada región cerebral (tejido completo del hipotálamo mediobasal) se sonicaron (vibra cell) en 500µl de ácido acético (Merck) al 20%. Del homogenado obtenido se tomaron alícuotas de 30µl para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). El homogenado sobrante se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4° C. Del sobrenadante se extrajeron 420µl al cual se le agregaron 800µl de metanol (J. T. Baker) al 100%, agitándose con vórtex (Daigger Vortex Genie 2) y se mantuvieron a -20° C durante 12 horas (Congelador y Refrigerador General Electric Profile). Las muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min a 4° C, se obtuvo todo el sobrenadante y se secó en el concentrador con vacío (Eppendorf Vacufuge 5301) para obtener el pellet utilizado en la cuantificación del TRH por radioinmunoensayo.

5.6 Radioinmunoensayo del TRH

El pellet del TRH se resuspendió en 250µl de buffer RIA para el núcleo accumbens, amígdala, hipocampo, hipotálamo mediobasal y septum, y en 500µl para la parte superior del hipotálamo y corteza frontal. Estas muestras se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 min a 4° C, se tomaron por duplicado 100µl del sobrenadante y se adicionaron 100µl de buffer RIA. Para hacer la curva estándar se prepararon tubos por triplicado que contenían las concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000pg del TRH (Sigma) en 100µl de buffer RIA (ver anexo). Se preparó un estándar interno hipotalámico, tubos por triplicado con 20, 40 80 160µl de un extracto de hipotálamo de rata que fueron resuspendidos en 100µl de buffer RIA. Se prepararon los tubos controles por triplicado: los totales (T) con 5000 cuentas por minuto (cpm) en 100µl; los NSB (unión no específica) con

200µl de buffer RIA y los B₀ (sin el TRH) con 100µl de buffer RIA. A todos los tubos excepto T y NSB se añadieron 100µl de anticuerpo contra el TRH (R₂ 1:100000), también a todos los tubos se les agregaron 100µl de I¹²⁵ TRH equivalente a 5000 cpm. Se agitaron los tubos y se dejaron incubar durante 48 horas a 4° C.

Transcurrido el período de incubación, se procedió a adicionar 1 ml de etanol frío al 100% (Merck) a todas las muestras excepto totales, se agitaron en un vórtex para lograr la precipitación del antígeno unido al anticuerpo y se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se aspiró y se determinaron las cpm de cada tubo durante 1 minuto en un aparato de conteo de radiaciones gamma (Wizard 1470).

Se convirtieron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de TRH utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log.

5.7 Cuantificación de Proteína Total por el Método de Lowry

A las muestras se les agregaron 30µl de NaOH (J. T. Baker) 4.5N y se dejaron hidrolizando de 12-18 horas a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas por duplicado: hipocampo y corteza frontal 10µl y para la parte superior del hipotálamo, núcleo accumbens, amígdala, septum e hipotálamo medio basal 20µl. Las alícuotas se completaron a un volumen de 200µl con NaOH 0.5N. Se preparó la curva estándar utilizando albúmina sérica bovina (BSA, Sigma), se prepararon tubos por duplicado que contenían 100µl de agua con las siguientes concentraciones de albúmina: 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100µg. Se añadieron 100µl de NaOH (Lowry et al., 1951).

A los tubos de la curva estándar y muestras se agregaron 900µl de Solución E (ver anexo), se agitaron y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente, después se adicionaron 100µl de Solución Folin 1N (Sigma Folin y Ciocalteus’s Phenol Reagent, folin 2N + H₂O 1:1), se agitaron en el vórtex y se dejaron incubar durante 30 min a temperatura

ambiente. La curva estándar y muestras se leyeron en un espectrofotómetro a 595nm (Eppendorf BioPhotometer).

5. 8 Radioinmunoensayo de Corticosterona

Se hizo una dilución 1:500 de todas las muestras de suero, se tomaron 10µl de suero y 5ml de buffer diluyente de esteroides (ver anexo). De la dilución se extrajeron 500µl de todas las muestras. Para hacer la curva estándar se tomaron 500µl por tubo y por triplicado de las soluciones preparadas de corticosterona estándar (ICN Farmacéutica) que contenían: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 5000pg en 500µl. Se prepararon los tubos controles por triplicado con las siguientes cantidades de buffer diluyente de esteroides: tubos de cpm totales (T) 800µl, tubos B₀ (sin corticosterona) 500µl, tubos NSB (unión no específica) 600µl. Todos los tubos se incubaron a 98° C durante 10 min, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

El anticuerpo (Ab) contra corticosterona (ICN Farmacéutica) se preparó a partir de alícuotas de 20µl a una dilución inicial de 1:12. Cada alícuota fue diluida con 1.98ml de agua destilada, para obtener una dilución de trabajo de 1:1200. Se adicionó a todos los tubos excepto T y NSB 100µl de Ab. Después se agregaron 100µl de corticosterona tritiada (³H-Cor, Amersham) [ver anexo], se agitaron los tubos y se incubaron por 24 horas a 4° C.

Transcurrido el período de incubación, se añadieron 200µl de la solución carbón-dextrán a 4° C a todos los tubos (excepto T), se agitaron por 20 segundos y se incubaron por 20 min a 4° C. Fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante de cada tubo se transfirió a tubos para conteo de radiaciones beta y se adicionaron 4ml de líquido de centelleo (Ecolite, ICN). Se determinaron las cpm de cada tubo durante 1 minuto en un aparato de conteo de radiaciones beta (Beckman).

Se transformaron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de corticosterona utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se muestran en ng/ml de corticosterona.

5.9 Radioinmunoensayo de TSH

La curva estándar se realizó por triplicado con 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000pg de TSH en 200µl de buffer RIA (ver anexo). Se preparó una curva con suero de ratas controles (eutiroideas) tubos por triplicado con 10, 25, 50, 100 y 200µl de suero y se completaron a 200µl con buffer RIA. Se prepararon tubos controles por triplicado: los totales (T), los NSB que se les agregó 300µl de buffer RIA y los B₀ con 200µl de buffer RIA. Para preparar los tubos de las muestras problema, se tomaron por duplicado 100µl de suero de cada muestra y se agregaron a todos los tubos 100µl de buffer RIA. A todos los tubos excepto T y NSB se les adicionaron 100µl de anticuerpo contra TSH (ver anexo).

Se incubaron todos los tubos a temperatura ambiente por 18-24 horas. Transcurrido el período de incubación se adicionaron a todos los tubos 100µl de la marca I¹²⁵ TSH equivalente a 10000 cpm y se dejaron incubar a temperatura ambiente por 18-24 horas. Después se añadieron a los tubos (excepto T) 100µl de AbIgG de conejo dilución 1:40 en buffer de fosfatos (ver anexo) y) 100µl de suero normal de conejo al 2% en PBS (ver anexo), los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionó a los tubos (excepto totales) 1ml de polietilenglicol al 4% en PBS y se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 min. Se aspiró el sobrenadante y se determinaron las cpm de cada tubo por 1 minuto en el aparato de conteo de radiaciones gamma (Wizard 1470).

Se convirtieron los valores de cpm de la curva estándar y de las muestras a pg de TSH utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log. Los resultados se muestran en ng/ml de TSH.

5.10 Análisis Estadísticos

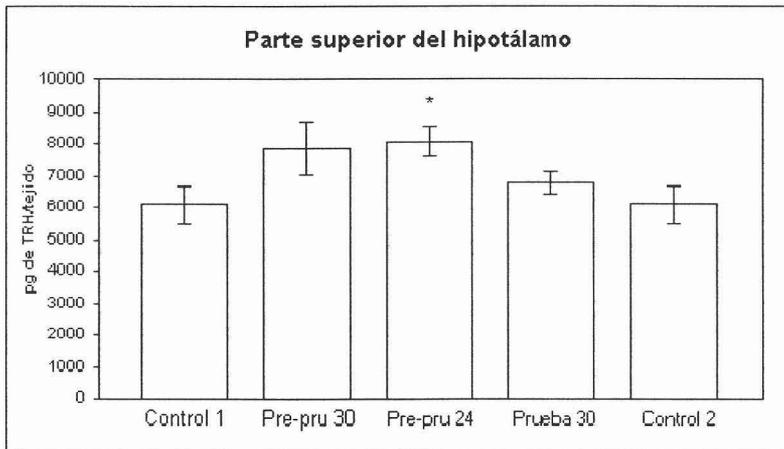
Se realizaron análisis de varianzas de dos vías (ANOVA) y prueba de post-hoc de Fisher para comparar entre los grupos controles y experimentales los datos obtenidos en las determinaciones bioquímicas y del análisis conductual. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

Se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson entre: pg de TRH por región y ng/ml de corticosterona; pg de TRH por región y número de cuentas de la conducta de inmovilidad; ng/ml de corticosterona y número de cuentas de la conducta de inmovilidad. Se consideró un coeficiente de correlación estadísticamente significativo cuando $r > 0.5$.

VI. RESULTADOS

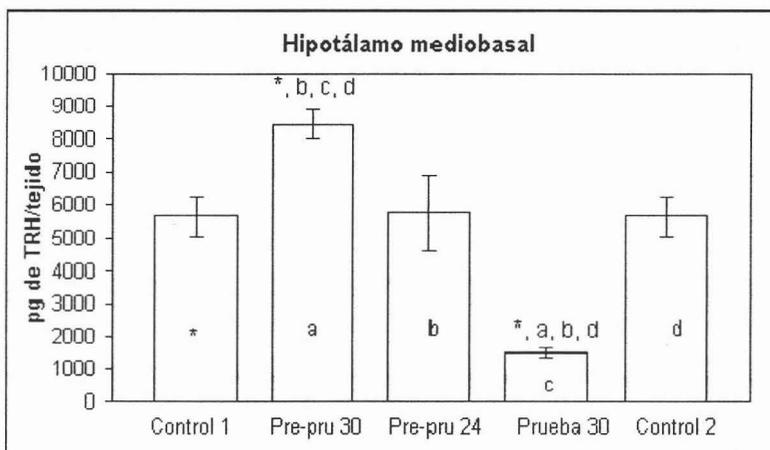
6.1 Cambios en el eje tiroideo

En la parte superior del hipotálamo (Gráfica 1) hubo un aumento significativo en el contenido del TRH ($F_{4, 37} = 2.28$; $p < 0.05$) en el grupo de pre-prueba 24 h de $129 \pm 13\%$ comparado con el $100 \pm 9\%$ del control 1 (el porcentaje de cambio hace referencia a pg de TRH/tejido, cuyo valor es similar al obtenido de TRH/mg de proteína, por lo que todas las gráficas se mostrarán en pg de TRH/tejido).



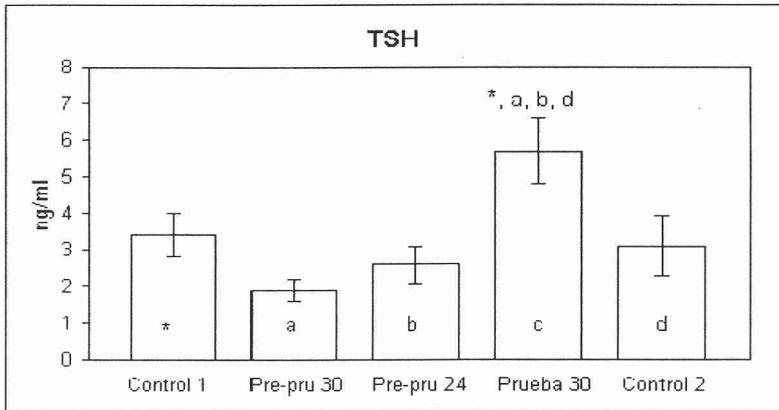
Gráfica 1. Contenido del TRH en la parte superior del hipotálamo. Ratas sometidas al modelo de nado forzado ($n = 10$, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg, media \pm error estándar de la media (media \pm ESM); * $p < 0.05$ comparado con los controles.

En el hipotálamo mediobasal (Gráfica 2) el contenido del TRH mostró un aumento significativo ($F_{4, 29} = 21.64$; $p < 0.05$) en pre-prueba 30 min ($149 \pm 8\%$) comparado con el control 1 ($100 \pm 11\%$), pre-prueba 24 h ($102 \pm 20\%$) y prueba 30 min ($26 \pm 3\%$); sin embargo el contenido del TRH disminuyó significativamente ($p < 0.001$) en prueba 30 min comparado con el control 2 ($100 \pm 12\%$).



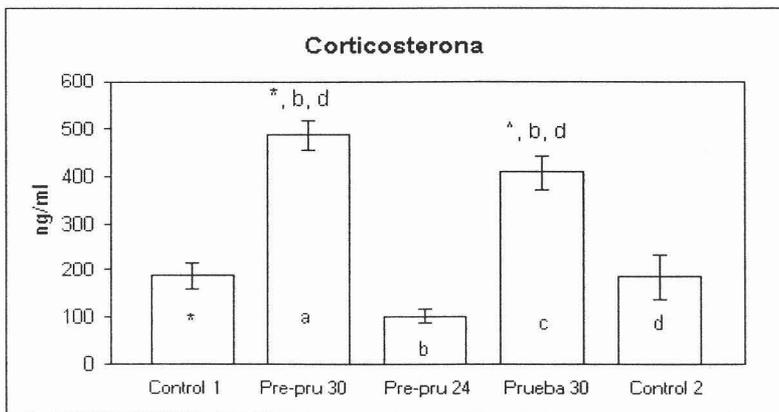
Gráfica 2. Contenido del TRH en el hipotálamo mediobasal. Ratas sometidas al modelo de nado forzado ($n = 10$, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg (media \pm ESM); $p < 0.05$ en pre-prueba 30 min *versus* control 1 (*), pre-prueba 24 h (b), prueba (c) y control 2 (d) y $p < 0.001$ en prueba 30 min *versus* *, b y d.

La concentración de TSH sérica (Gráfica 3) sólo mostró cambio en el grupo de prueba 30 min, en donde se observó un aumento significativo ($178 \pm 28\%$; $F_{4, 32} = 4.27$; $p < 0.05$) con respecto al control ($100 \pm 26\%$) y a los otros grupos.



Gráfica 3. Concentración de TSH sérica medida en ratas sometidas al nado forzado y animales control. Los datos están expresados en ng/ml (media \pm ESM); $n = 10$; $p < 0.05$ en prueba 30 min *versus* control 1 (*), pre-prueba 30 min (a), pre-prueba 24 h (b) y control 2 (d).

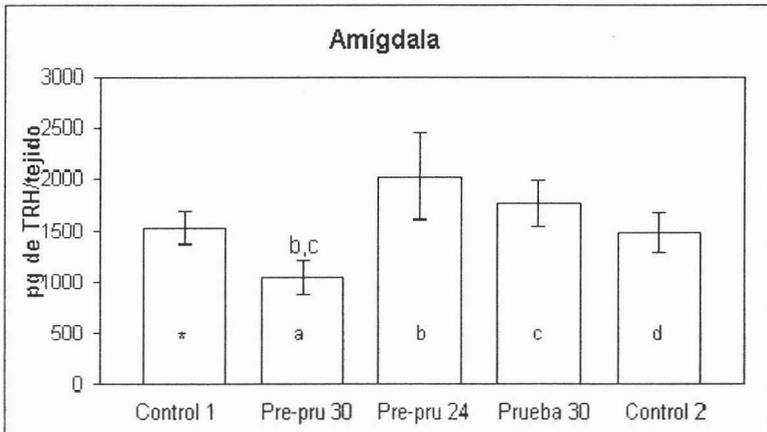
El contenido de corticosterona en suero (Gráfica 4) aumentó significativamente ($F_{4, 37} = 19.7$; $p < 0.0001$) en los grupos de pre-prueba 30 min ($257 \pm 17\%$), asimismo en prueba 30 min ($211 \pm 18\%$; $p < 0.001$) comparándolos con el control 1 ($100 \pm 15\%$) y el control 2 ($98 \pm 24\%$); en pre-prueba 24 h la concentración de corticosterona fue igual a los controles.



Gráfica 4. Concentración de corticosterona en suero medida en ratas sometidas al nado forzado y animales control. Los datos están expresados en ng/ml (media \pm ESM); $n = 10$; $p < 0.001$ en prueba *versus* control 1 (*), pre-prueba 24 (b) y control 2 (d) o $p < 0.0001$ en pre-prueba 30 *versus* *, b y d.

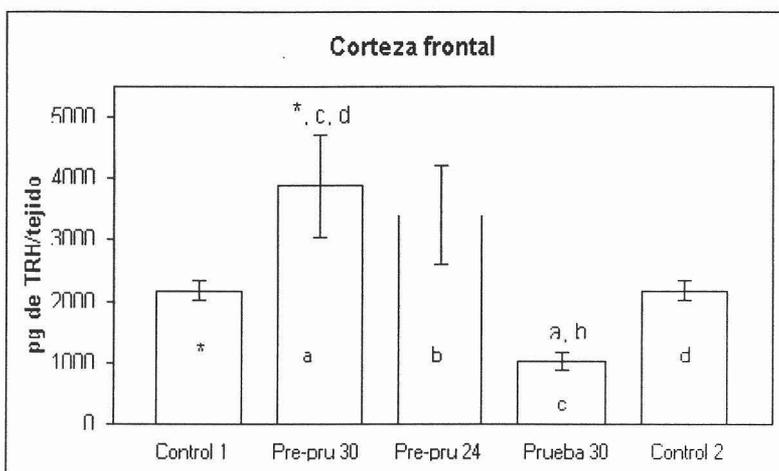
6.2 Cambios en el sistema límbico

En la amígdala (Gráfica 5) el único cambio en el contenido del TRH, fue en pre-prueba 30 min ($68 \pm 10\%$), en donde disminuyó significativamente ($F_{4, 35} = 2.16$; $p < 0.05$) respecto a pre-prueba 24 h ($133 \pm 28\%$) y prueba 30 min ($115 \pm 15\%$).



Gráfica 5. Contenido del TRH en la amígdala. Ratas sometidas al modelo de nado forzado ($n = 10$, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg (media \pm ESM); $p < 0.05$ en pre-prueba 30 min *versus* pre-prueba 24 h (b) y prueba 30 min (c).

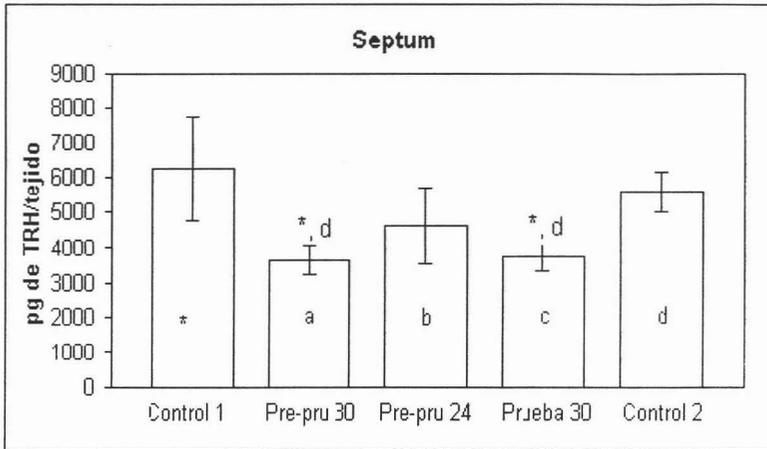
En la corteza frontal (Gráfica 6) se presentó un incremento significativo ($F_{4, 34} = 4.11$; $p < 0.05$) en la concentración del TRH en el grupo de pre-prueba 30 min ($178 \pm 38\%$) con respecto al control 1 ($100 \pm 7\%$) y al grupo de prueba 30 min ($47 \pm 7\%$), en este último grupo hubo una disminución significativa comparado con pre-prueba 24 h ($156 \pm 37\%$; $p < 0.05$).



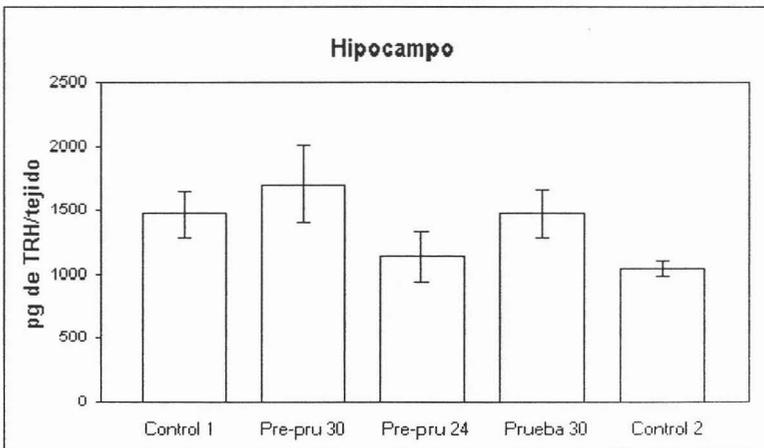
Gráfica 6. Contenido del TRH en la corteza frontal. Ratas sometidas al modelo de nado forzado (n = 10, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg (media \pm ESM); $p < 0.05$ en pre-prueba 30 min *versus* control 1 (*), prueba 30 min (c) y control 2 (d) y diferencia significativa en prueba 30 min *versus* pre-prueba 24 h (b).

En el septum (Gráfica 7) la concentración del TRH disminuyó significativamente ($F_{4, 29} = 2.69$; $p < 0.05$) en pre-prueba 30 min ($58 \pm 6\%$) comparado con el control 1 ($100 \pm 23\%$); la disminución también resultó significativa ($p < 0.05$) en prueba 30 min ($59 \pm 6\%$) comparado con el control 2 ($90 \pm 9\%$).

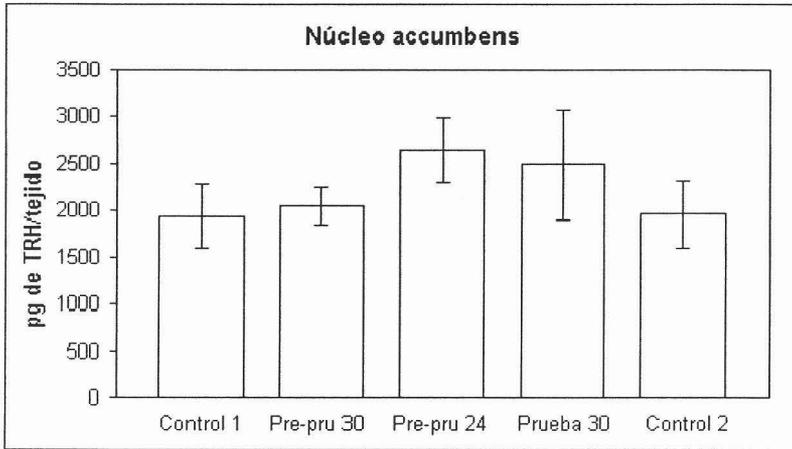
En el hipocampo (Gráfica 8) y en el núcleo accumbens (Gráfica 9) no existieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración del TRH al comparar entre los grupos controles y los experimentales.



Gráfica 7. Contenido del TRH en el septum. Ratas sometidas al modelo de nado forzado (n = 10, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg (media \pm ESM); $p < 0.05$ en pre-prueba 30 min *versus* control 1 (*) y control 2 (d) y en prueba 30 min *versus* * y d.

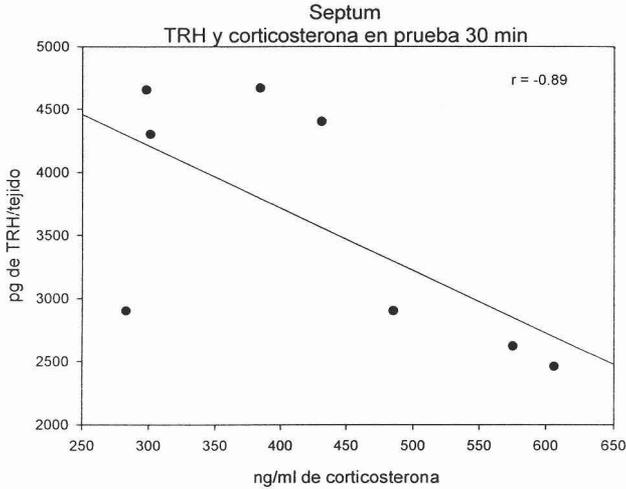


Gráfica 8. Contenido del TRH en el hipocampo. Ratas sometidas al modelo de nado forzado (n = 10, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg (media \pm ESM).



Gráfica 9. Contenido del TRH en el núcleo accumbens. Ratas sometidas al modelo de nado forzado (n = 10, por grupo); día 1 el grupo de pre-prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y el de pre-prueba 24 h (sacrificadas 24 h después), día 1 y 2 el de prueba 30 min (sacrificadas 30 min después) y animales controles. Los valores están expresados en pg (media \pm ESM).

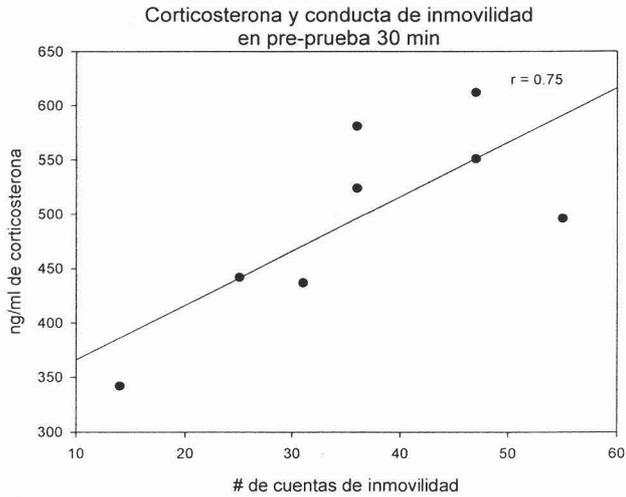
Se realizaron correlaciones entre los valores de la concentración de corticosterona sérica y los del contenido del TRH por región, en cada grupo experimental. Se encontró una correlación significativa ($r > 0.5$; $p < 0.05$) en el septum en prueba 30 min (Gráfica 10) observándose que si aumenta la corticosterona disminuye el contenido del TRH (no hubo correlación significativa en pre-prueba 30 min).



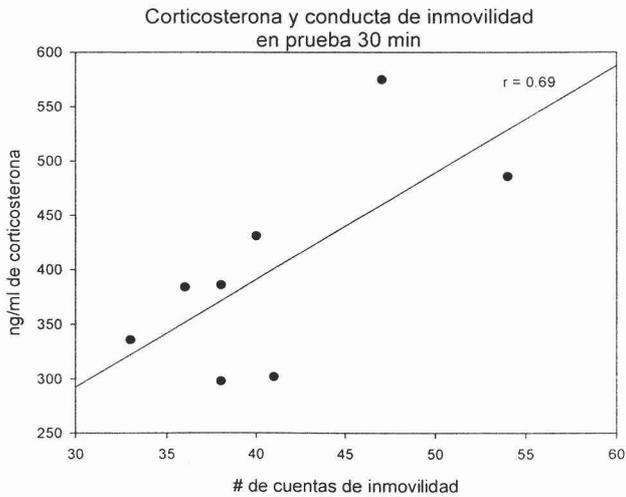
Gráfica 10. Correlación de Pearson entre la disminución del contenido del TRH en el septum y el aumento en la concentración de corticosterona, en prueba 30 min: $r = -0.89$, $p < 0.05$.

Se correlacionaron los cambios en la concentración de corticosterona en suero y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad (ver anexo 2) en cada grupo experimental; se presentaron correlaciones significativas ($r > 0.5$; $p < 0.05$) en pre-prueba 30 min (Gráfica 11) y en prueba 30 min (Gráfica 12), indicando que los dos parámetros analizados aumentan paralelamente en ambos grupos.

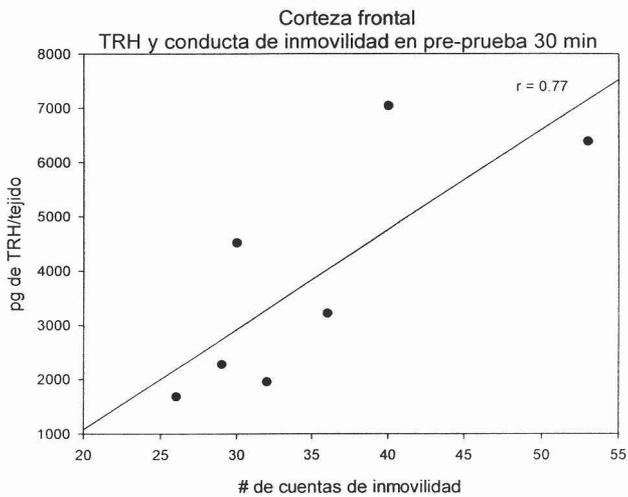
Se hicieron correlaciones entre los cambios del contenido del TRH por región y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad; obteniéndose correlaciones significativas ($r > 0.5$; $p < 0.05$) en la corteza frontal en el grupo de pre-prueba 30 min (Gráfica 13), observándose que entre mayor contenido del TRH más inmovilidad se presenta y en el septum en prueba 30 min (Gráfica 14), en donde hay menor contenido del péptido conforme aumenta la inmovilidad.



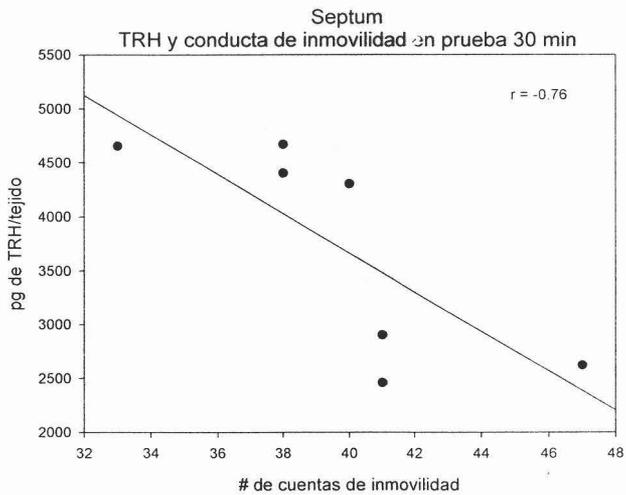
Gráfica 11. Correlación de Pearson entre el aumento de corticosterona y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad, en pre-prueba 30 min: $r = 0.75$, $p < 0.05$.



Gráfica 12. Correlación de Pearson entre el aumento de corticosterona y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad, en prueba 30 min: $r = 0.69$, $p < 0.05$.



Gráfica 13. Correlación de Pearson entre el aumento del contenido del TRH en la corteza frontal y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad, en pre-prueba 30 min: $r = 0.77$, $p < 0.05$.



Gráfica 14. Correlación de Pearson entre la disminución del contenido del TRH en el septum y el número de cuentas de la conducta de inmovilidad, en prueba 30 min: $r = -0.76$, $p < 0.05$.

El contenido del TRH aumentó o disminuyó significativamente dependiendo de la región y tiempo de estudio, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de los cambios en el contenido del TRH en las diferentes regiones cerebrales en sus respectivos tiempos de estudio.

Área	Pre-prueba 30 min	Pre-prueba 24 h	Prueba 30 min
Parte superior del hipotálamo	—	↑	—
Hipotálamo mediobasal	↑	—	↓
Amígdala	↓	—	—
Corteza Frontal	↑	—	↓
Septum	↓		↓
Núcleo accumbens	—	—	—
Hipocampo	—	—	—

↑ Denota incremento significativo en el contenido del TRH comparado con el control.

↓ Denota disminución significativa en el contenido del TRH comparado con el control. En la amígdala es comparado con los dos grupos experimentales.

— Contenido del TRH similar al control.

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se cuantificó el contenido del TRH en regiones límbicas, con el objetivo de determinar si las neuronas TRHérgicas de alguna región responden al paradigma experimental. El contenido del péptido puede ser el resultado de varios eventos como son: biosíntesis, procesamiento, liberación y degradación; que acontecen en coordinación y son susceptibles a regulación. Estímulos hormonales (por ejemplo la corticosterona), neuronales y otros efectores como el frío y la succión pueden afectar la biosíntesis o la liberación del TRH, esto se refleja en un aumento o disminución en el contenido del TRH o de su RNAm, que a su vez indica la activación de las vías TRHérgicas (Zoeller et al., 1990; Uribe et al., 1993; Covarrubias et al., 1994). También puede ocurrir incremento o disminución en el procesamiento de TRHgly a TRH, afectando así la concentración del TRH. La degradación intracelular no parece estar involucrada en determinar el contenido del TRH, ya que la PPII entra en contacto con el péptido, cuando es liberado (Charli et al., 1987, 1988).

Alteraciones en la actividad neuronal del SNC, pueden resultar en una hiper- o hipofunción de las neuronas, que clínicamente puede manifestarse como depresión. El sistema neuronal TRHérgico puede activarse por la perturbación en la función del SNC y responder para restituir la homeostasis del sistema, lo que puede implicar cambios en el metabolismo TRHérgico (Gary et al., 2003).

7.1 Cambios en el eje HHT

7.1.1 *Parte superior del Hipotálamo*

El aumento en el contenido del TRH en el grupo de pre-prueba 24 h podría deberse a un previo aumento en la concentración del RNAm del TRH. Lo anterior resulta más factible que un aumento en el procesamiento del precursor del péptido, puesto que Pekary et al., (2000) encontraron que el contenido de TRHgly en el hipotálamo de ratas sometidas al nado forzado y ratas controles fue similar, sugiriendo que el nado forzado no provoca aumento en la conversión de TRHgly a TRH en ésta región.

Entre las moléculas que pueden tener efecto sobre la expresión del gen de TRH en el hipotálamo está la corticosterona, la cual *in vivo* se ha demostrado que la inhibe (Kakucska et al., 1995), mientras que *in vitro* aparece tanto una inhibición como un aumento dependiendo de la concentración de dexametasona utilizada (Pérez-Martínez et al., 1998) y además existe una interacción con otras proteínas que afectan la expresión del TRH tales como CREBP y proteína cinasa I (API), por lo que los cambios en el TRH son resultado de diferentes efectores sobre las neuronas que lo sintetizan, sin embargo, en este estudio no podemos saber que otros factores pudieran tener efecto sobre la expresión del TRH. Por otro lado, la disección de la parte superior del hipotálamo en este estudio no sólo incluyó el NPV sino otros núcleos que sintetizan el TRH, sin embargo el aumento de glucocorticoides (GC) no parece ser el responsable de cambios en la síntesis del péptido, puesto, que en pacientes con depresión tratados con corticosteroides se ha observado una disminución en la expresión del TRH en el NPV del hipotálamo (Alkemade et al., 2004).

7.1.2 Hipotálamo mediobasal (o eminencia media) y TSH.

La segunda sesión de nado forzado (grupo de prueba 30 min) incrementó la liberación del TRH en el hipotálamo mediobasal (sin presentar cambio en la parte superior del hipotálamo) y apareció un consecuente aumento de tirotropina en suero; esto pareció ser específico de la conducta relacionada con depresión, ya que el mismo estímulo de la primera sesión (pre-prueba 30 min) no alteró el funcionamiento del eje tiroideo. En pacientes con depresión el aumento de GC provoca un aumento en la liberación del TRH (James et al., 1994; Bahls y Carvalho, 2004) tal como se observa en el grupo de prueba 30 min.

Se ha reportado en pacientes con depresión que la respuesta de TSH a TRH disminuye (Loosen y Prange, 1982; Nemeroff, 1989), mientras que en otros se reporta un incremento (Kraus et al., 1997), este último coincide con la activación del eje tiroideo en el grupo de prueba 30 min. En este estudio no encontramos la baja respuesta de TSH a TRH ya que inclusive en pre-prueba 30 min, la concentración de TSH no disminuyó.

En estudios posteriores sería conveniente incluir un grupo experimental sacrificado a un tiempo posterior a 30 min para determinar si la liberación del TRH permanece o no y si lleva a cambios adaptativos en la respuesta de TSH a TRH por inhibición de la síntesis de los receptores del TRH, tal como se ha propuesto (Kjeiiman et al., 1984; Nemeroff, 1989; Jackson y Asamoah, 1999).

La regulación diferente del eje HHT en prueba 30 min con respecto a la pre-prueba 30 min, sugiere una adaptación y respuesta diferencial a similares y repetidos estímulos (Duman, 1999). Es posible que la influencia de algún neurotransmisor pueda estimular la liberación del TRH. En este sentido, Toni y Lechan, (1993) identificaron que la NE estimula la secreción del TRH, además, se ha reportado que neuronas noradrenérgicas innervan densamente la parte medial y externa de la eminencia media (Sawchenko y Swanson, 1982) y se ha documentado que el neurotransmisor está involucrado en la fisiopatología (por las alteraciones en los niveles de NE y sus receptores) y tratamiento de la depresión (ya que los antidepresivos aumentan los niveles de NE y la activación de sus receptores) [Duman, 1999]. La segunda sesión de nado forzado induce en ratas un aumento en la liberación de NE de la corteza prefrontal y del hipocampo (Jordan et al., 1994; Yoshitake et al., 2004), esta misma respuesta de la NE por el nado, pudo acontecer en el hipotálamo mediobasal, apoyando la idea de que el aumento en la liberación del TRH en prueba 30 min fue en parte por la estimulación de la vía noradrenérgica. En el presente estudio no es posible determinar la relación entre la vía TRHérgica y la del neurotransmisor, pero puede ser la base para la realización de estudios posteriores sobre su interacción en el hipotálamo mediobasal.

7.1.3 *Corticosterona*

La concentración de corticosterona sérica aumentó significativamente en los grupos de pre-prueba 30 min y prueba 30 min comparados con los controles, esto puede considerarse como una respuesta endócrina de las ratas al estrés. Se ha reportado en diferentes cepas de ratas y ratones, que al ser sometidos al modelo de nado forzado (las dos sesiones y sacrificadas 30 min después), presentan un aumento en la secreción de corticosterona en suero (Armario et al., 1995; Rittenhouse et al., 2002), tal como se observó en nuestros

resultados. Además pacientes con depresión exhiben un incremento de la actividad del eje HHA, que produce una excesiva producción de cortisol (Nelson y Randy, 2000). El grupo de pre-prueba 24 h se recuperó al estímulo estresante y su concentración de corticosterona fue similar a la del grupo control.

El aumento en la concentración de corticosterona está relacionado con la depresión y ésta a su vez con la conducta de inmovilidad que presentan los animales sometidos al modelo de nado forzado, por lo que es posible pensar en que el modelo funcionó adecuadamente, induciendo en la ratas un estado similar a la depresión. Aunque el modelo de nado forzado induce un estrés agudo y la depresión resulta de uno crónico, pudimos observar una correlación positiva entre la conducta de inmovilidad y la concentración de corticosterona en los grupos de animales sometidos al nado forzado una o dos veces (pre-prueba y prueba).

7.2 Cambios en el sistema límbico

7.2.1 Amígdala

En el grupo de pre-prueba 30 min disminuyó el contenido del TRH, lo que sugiere su liberación. La amígdala es un importante componente del circuito neural que media las respuestas inducidas por estrés (Vyas et al., 2004). Existen evidencias de que la amígdala se activa para formar la memoria emocional de experiencias (principalmente situaciones que provocan miedo) y estímulos percibidos por un animal (Diamond et al 2004). Moriceau et al., (2004) mencionan que el aumento en la concentración de corticosterona influye en la actividad de la amígdala que a su vez permite expresiones conductuales ante el miedo. Se ha encontrado en ratas una baja concentración del TRH y del número de sus receptores en la amígdala por efecto del estrés inducido por inmovilidad de restricción (Takayama et al., 1986), lo que apoya la idea de que el estrés ocasionado por el nado forzado influye en el cambio del contenido de TRH en pre-prueba 30 min. La concentración del TRH disminuye en la amígdala de humanos con depresión post mórtem (Biggins et al., 1983), esto concuerda con los resultados obtenidos en pre-prueba 30 min, pero en el caso del grupo de prueba 30 min no se presenta esta baja concentración, más bien los datos muestran un valor

similar al de los controles y al de pre-prueba 24 h, sugiriendo que esta región responde diferente ante la repetición del nado forzado. Existe un estudio que indica que el número de receptores de corticosterona disminuye en la amígdala de ratas que presentan un aumento sostenido de corticosterona circulante por la repetición de un estímulo estresante (Sapolsky et al., 1984), y como se sabe que la corticosterona regula el metabolismo TRHérgico, el anterior reporte sugiere que en la segunda sesión de nado forzado puede comenzar a disminuir el número de receptores de corticosterona, lo que pudo implicar una respuesta diferente entre la pre-prueba y prueba de nado.

7.2.2 *Corteza frontal*

Estudios sobre el efecto del estrés inducido por el modelo de nado forzado, reportan que se altera la función de sistemas de neurotransmisión (NE, DA y 5-HT) en la corteza frontal, implicándola en la fisiopatología de la depresión (Kelliher et al., 2000; Fujino et al., 2002). En el presente experimento se encontraron cambios en el contenido del TRH en la corteza frontal, la concentración del péptido aumentó significativamente en el grupo de pre-prueba 30 min, considerando que el estrés pudo influir en esta respuesta. Existe evidencia que indica que hay una alta expresión del RNAm de los receptores de GC en la corteza de ratas [naive] (Sousa et al., 1989). La actividad de neurotransmisores como la NE, la DA y la 5-HT también pueden mediar la respuesta de la vía TRHérgica, ya que se ha reportado en la corteza frontal cambios en el contenido y liberación de estos neurotransmisores entre la pre-prueba y prueba de nado forzado (Jaffe et al., 1993; Jordan et al., 1994; Fujino et al., 2002), aunque no hay evidencia anatómica que apoye directamente la acción de la NE, DA y 5-HT sobre las neuronas TRHérgicas en la corteza frontal, se propone esta relación porque en otras regiones como el hipotálamo y la eminencia media existe colocalización del TRH con NE y DA y en el núcleo de raphé el péptido colocaliza con 5-HT (Price et al., 1983; Sawchenko y Swanson, 1982; Hokfel et al., 1989; Toni y Lechan, 1993).

La estimulación de la corteza frontal con descargas eléctricas o químicas induce la inmovilidad en ratas (Leung et al., 2000), y las descargas eléctricas aumentan el contenido del TRH (Sattin et al., 1994). La corteza frontal parece estar involucrada en la manifestación de la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado, ya que en este

estudio se encontró una correlación significativa entre el aumento en la concentración del TRH y el número de cuentas de inmovilidad en el grupo de pre-prueba 30 min, sugiriendo que la falta de liberación del TRH en la corteza frontal provoca que las ratas presenten una mayor frecuencia de la conducta de inmovilidad durante la primera sesión de nado. Una segunda exposición al nado provocó una disminución significativa en la concentración del TRH en el grupo de prueba 30 min comparado con pre-prueba 30 min y 24 h, probablemente se haya liberado el péptido. Se ha reportado que en la corteza frontal de individuos con depresión (analizados post mórtem) presentaron bajos niveles del RNAm de los receptores de GC, considerando la desregulación de los mismos en el trastorno afectivo (Webster et al., 2002). El estrés ocasionado por inmovilización (restricción) induce una reducción en el contenido del TRH en la corteza frontal de ratas (Takayama et al., 1986), sugiriendo que el estrés del nado forzado produjo un efecto diferente o falta de estimulación en las neuronas TRHérgica del grupo de prueba 30 min.

En el grupo de pre-prueba 24 h no hubo cambios significativos en el contenido del TRH con respecto a los controles, así el efecto del nado forzado sobre la vía TRHérgica de la corteza frontal fue transitorio, como se ha observado en otros paradigmas a ese tiempo de estudio, por ejemplo la administración de etanol induce cambios en el contenido del TRH en horas posteriores, pero transcurridas 24 h el contenido del péptido retorna a niveles basales en la corteza frontal (de Gortari et al., 2000).

7.2.3 Septum

Existe evidencia de que el septum lateral regula procesos relacionados con el estado de ánimo y la motivación; modula respuestas conductuales (relacionadas con el miedo) cuando su actividad neural es estimulada o inhibida, además de influir en la fisiopatología de la depresión y en la eficacia terapéutica de drogas antidepressivas (Sheehan et al., 2003; 2004).

Se ha reportado que la concentración del TRH y la unión con su receptor disminuyen en el septum a causa del estrés inducido por inmovilización [de restricción] (Takayama et al., 1986). Nuestros datos indican que si bien la concentración de corticosterona está elevada en pre-prueba 30 min y en prueba 30 min, sólo hay correlación significativa con el contenido

del TRH (disminución) en la prueba 30 min. Esto significa que los cambios del TRH no necesariamente se deben al estrés experimentado por los animales al someterse por primera vez al nado.

El septum lateral ha sido implicado en la mediación de un déficit conductual conocido como desesperanza aprendida (Ronan et al., 2000), la cual se asocia con la conducta de inmovilidad observada en los animales sometidos al modelo de nado forzado. La tasa de disparo de las neuronas del septum está relacionada con los aspectos motivacionales de la conducta (Thomas 1988; Gogate et al., 1995). Contreras et al., 2004 observan una disminución en la tasa de disparo de las neuronas del septum lateral en un 50% de ratas sometidas a dos sesiones de nado forzado (15 min el primer día, y 5 minutos el segundo), y sugieren que esto está relacionado con un aumento en la liberación de serotonina en el septum lateral, ya que la 5HT tiene un efecto inhibitor en la tasa de disparo de las neuronas. Además, en el núcleo del raphé dorsal aumenta la liberación de la serotonina por la administración de fluoxetina (inhibidor de la recaptura de 5HT), provocando una disminución de 5HT en el septum y un consecuente aumento de la tasa de disparo y a su vez de la movilidad de las ratas. La serotonina y el TRH colocalizan en las neuronas del raphé, de modo que esto sugiere que la disminución en el contenido del TRH que nosotros observamos tanto en pre-prueba 30 min como en prueba 30 min puede relacionarse con un aumento de la liberación del péptido tal como se ha visto para serotonina y puesto que correlaciona negativamente con la inmovilidad (en prueba 30 min), es posible que igual que 5HT, en esta zona está funcionando como un depresor. La otra posibilidad es que el efecto inhibitor de 5HT sobre las neuronas del septum esté afectando la liberación del TRH y por lo tanto la disminución de contenido y liberación del péptido sean cambios compensatorios y entonces sí se podría considerar un antidepresivo. Para conocer lo anterior se necesitaría medir la liberación del TRH.

Se ha encontrado que el estrés inducido por inmovilización [de restricción] afecta transitoriamente la liberación del TRH en el septum *in vitro*, ya que retorna a condiciones basales 3 horas después dado el estímulo (Kiss et al., 2004), una condición similar pudo

presentarse en los animales que nadaron, ya que en el grupo de pre-prueba 24 h la concentración del péptido fue aproximado al control.

7.2.4 Hipocampo

El hipocampo es una región límbica susceptible al estrés (Meaney et al., 1993), los altos niveles de GC observados durante condiciones de estrés, han sido asociados con daño en las neuronas hipocampales, el trastorno de estrés postraumático se relaciona con la reducción del volumen hipocampal, déficits en la función de la memoria declarativa y se ha encontrado un volumen reducido del hipocampo en pacientes con depresión mayor (Bremner et al., 1995; Bremner, 1999). En el presente trabajo no se encontraron cambios significativos en el contenido del TRH hipocampal entre grupos experimentales y controles, por lo que es posible que el estrés de cada sesión de nado no fue suficientemente fuerte o duradero para inducir la activación o inhibición de las neuronas TRHérgicas. Existe evidencia de alteraciones en el nivel del RNAm del receptor de GC específicas al estresor (Karandrea et al., 2002), por ejemplo en el hipocampo de rata macho tiende a incrementar el nivel del RNAm de estos receptores, después de la segunda sesión de nado forzado (Drossopoulou et al., 2004), es posible que en el presente estudio faltaran otros tiempos de estudio para evidenciar si el metabolismo del TRH en el hipocampo es afectado por la corticosterona o permanecen condiciones similares a las reportadas.

7.2.5 Núcleo Accumbens

El núcleo accumbens está involucrado en el desarrollo de trastornos depresivos (Nestler et al., 2002), en los mecanismos de recompensa de consumo de drogas (Koob, 1992), en la motivación (Fibiger, 1993) y en la actividad locomotora (Mogenson et al., 1980). El contenido del TRH disminuye en el núcleo accumbens después de la aplicación de choques electroconvulsivos (Lighton et al., 1984b) y por la administración de litio (Sattin et al., 2002). En este estudio no se presentaron cambios en la concentración del TRH de grupos experimentales y controles, infiriendo que la actividad física que implica el nado forzado no afectó la vía TRHérgica. El estrés de la prueba de nado tampoco indujo cambios en el metabolismo del TRH, se ha reportado que sistemas de neurotransmisión como el dopaminérgico y serotoninérgico del núcleo accumbens sí son afectados por el nado

forzado (Zangen et al., 2001), por lo anteriormente mencionado, resulta sugerente que la vía TRHérgica a largo plazo podría ser alterada por su interacción con DA y 5-HT.

Los resultados indican que la primera sesión de nado forzado aumenta significativamente el contenido del TRH después de 30 minutos en el hipotálamo mediobasal y en la corteza frontal y hasta 24 h después en la parte superior del hipotálamo, pero el contenido del TRH disminuyó significativamente en la amígdala y el septum. Una segunda sesión de nado forzado no indujo cambios en la parte superior del hipotálamo ni en la amígdala, sin embargo provocó el mismo efecto en el septum, pero en contraste con primer día disminuyó la concentración del TRH en el hipotálamo mediobasal y en la corteza frontal. Kirby y Lucki (1997) encontraron cambios significativos en la concentración extracelular de 5-HT únicamente después de la primera sesión de nado forzado, incrementando el nivel de 5-HT en el estriado, pero disminuyendo en el septum lateral, indicando que el efecto del nado forzado en el sistema serotoninérgico es región-específico y diferente en una segunda exposición. Estos datos sugieren que algo similar ocurre en el sistema TRHérgico, ya que la parte superior del hipotálamo y la amígdala responden con cambios en el contenido del TRH sólo en la primera sesión de nado. La amígdala está involucrada en la asignación del significado afectivo de estímulos estresantes (Rogan y LeDoux, 1996), además de regular la expresión de diferentes conductas y respuestas neuroendócrinas, ya que proyecta hacia el NPV del hipotálamo (Gray et al 1989), por lo anterior, resulta sugerente que la vía del TRH tiene una regulación similar en la amígdala que en el hipotálamo.

La respuesta diferencial del sistema TRHérgico en las regiones del eje HHT y límbicas puede ser consecuencia de las interacciones que tienen las neuronas de TRH con sistemas de neurotransmisión, por ejemplo el dopaminérgico que se subdivide en varios sistemas, tal como el mesolímbico y mesocortical, este último, proyecta principalmente hacia la corteza frontal, la cual es parte importante en las funciones cognitivas y en la manifestación de respuestas conductuales (Glowinski et al., 1977; Smelik, 1987). Se ha reportado que experiencias estresantes alteran el metabolismo y liberación de la DA (Imperato et al., 1992), sin embargo la repetida exposición al estrés puede provocar respuestas diferentes en

el sistema dopaminérgico (Tafet y Bernardini, 2003). Por otro lado, el sistema noradrenérgico que es regulado primariamente por el núcleo del locus coeruleus y que proyecta hacia la amígdala, el hipocampo, la corteza frontal y el hipotálamo (Charney et al., 1995), presenta alteraciones, particularmente, por la exposición a un estrés incontrolable o del que no se puede escapar (como el nado forzado) [Robbins y Everitt, 1995]. Lo anterior mencionado, sugiere que la respuesta del sistema TRHérgico puede estar influenciada por la actividad de los neurotransmisores durante el nado forzado y está actividad no es la misma en las distintas regiones límbicas. Sin embargo, los cambios del TRH son diferentes dependiendo del tipo de estrés al que se somete a los animales y al tipo de conducta que tienen como respuesta, ya que en modelos de ansiedad (enterramiento defensivo) los cambios encontrados son en la amígdala e hipotálamo pero no aparecen en corteza frontal y septum; una hora después de una inyección i.p. de etanol (3g/kg de peso) causa elevación de la concentración de corticosterona que produce cambios en el contenido del TRH en hipocampo y núcleo accumbens (de Gortari et al., 2000), regiones en las que el nado forzado no produce efecto. Además, el hecho de que hay diferencias en el contenido del TRH dependiendo de si los animales se someten una o dos veces al nado forzado, sugiere que sí puede estar participando en la conducta de inmovilidad (causada por la desesperanza que experimentan los animales en esta prueba) y no a cambios en movilidad.

VIII. CONCLUSIONES

1. Los cambios encontrados en el contenido del TRH en la prueba de nado forzado son tejido específicos y varían con el tiempo, lo que implica la activación de las vías TRHérgicas en ratas sometidas al modelo de nado forzado de Porsolt y se sugiere que el TRH del sistema límbico y del eje HHT participa en cambios de la conducta de inmovilidad.
2. La correlación entre la corticosterona y el contenido del TRH indican que la vía TRHérgica del septum, en prueba 30 min, es la más susceptible al estrés inducido por el nado forzado.
3. La correlación entre la corticosterona y la conducta de inmovilidad, en pre-prueba 30 min y prueba 30 min, indica que el estrés de la prueba de nado forzado induce desesperanza en las ratas.
4. El aumento en el contenido del TRH de la corteza frontal y la disminución en el contenido del TRH del septum facilitan la manifestación de la conducta de inmovilidad, así el TRH tiene una participación diferente dependiendo de la región.

IX. PERSPECTIVAS

Se recomienda cuantificar el contenido del RNAm de TRH en el sistema límbico para conocer si la biosíntesis del péptido se modifica en el modelo de nado forzado, además, para establecer si el procesamiento del TRH es alterado será conveniente cuantificar TRHgly, asimismo, el RNAm de los receptores del TRH para determinar la activación o inhibición de la vía TRHérgica, con estos datos se podrían especificar los eventos involucrados en los cambios del contenido del TRH en las regiones límbicas. Para conocer las interacciones entre los sistemas de neurotransmisión y el TRHérgico se podrían usar fármacos que intervinieran en su función.

REFERENCIAS

- Albert M., Jenike M., Nixon R., y Nobel K. 1993. **Thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in patients with dementia of the Alzheimer type.** *Biol. Psychiatry* 33:267-271.
- Alkemade A., Unmehopa U. A., Wiersinga W. M., Swaab D. F., y Fliers E. 2004. **Glucocorticoids decrease TRH mRNA expression in the paraventricular nucleus (PVN) of the human hypothalamus.** *Journal of Clin. Endocri. & Metab.* 10:2-11.
- Altar CA. 1999. **Neurotrophins and depression.** *Trends Pharmacol. Sci.* 20:59-61.
- American Psychiatric Association. 1994. **Diagnostic and statistical manual of mental disorders.** 4th ed. American Psychiatric Press, Washington, D. C.
- Annunziato L., DiRenzo G., Lombardi G., Scopacasa F., Schettini G., Preziosi P., y Seapagnini U. 1977. **The role of central noradrenergic neurons in the control of thyrotropin secretion in the rat.** *Endocrinology* 100: 738.
- Arborelius L., Owens M. J., Plotsky P. M., y Nemeroff C. B. 1999. **The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders.** *Journal of Endocrinology* 160:1-12.
- Armario A., Gavaldà A., y Martí J. 1995. **Comparison of the behavioral and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats.** *Psychoneuroendocrinology* 20:879-890.
- Arnold R., Klingberg F., y Schaker W. 1991. **Systemically applied thyrotropin-releasing hormone (TRH) modifies spontaneous behavior of rats.** *Biomed. Biochim. Acta* 50: 1217-1224.
- Bahls S. C. y Carvalho G. A. 2004. **The relation between thyroid function and depression: a review.** *Rev. Bras. Psychiatry.* 26:40-48.
- Ballar T. M., Hunter A. J., y Bennett G. W. 1996. **Effect of a thyrotropin-releasing hormone analogue, RX77368, on AMPA-induced septal-hippocampal lesioned rats in an operant delayed non-matching to position test.** *Psychopharmacology (Berl)* 127:265-275.
- Banki C. M., Bissette G., Arato M., y Nemeroff C.B. 1988. **elevation of immunoreactive CSF TRH in depressed patients.** *Am. J. Psychiatry* 145:1526-1531.
- Bassiri R., y Utiger R. 1973. **Metabolism and excretion of exogenous thyrotropin-releasing hormone in humans.** *J. Clin. Invest.* 52:1616-1619.

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

Bauer K., Novak P., y Kleinkauf H. 1981. **Specificity of a serum peptidase hydrolysing thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond.** Eur. J. Biochem. 118:173-183.

Bear M. F., Connors B. W., y Paradiso M. A. 1996. **Neuroscience: Exploring the brain.** Williams & Wilkins. Canada. Pp. 437-441.

Beato M. 1989. **Gene regulation by steroid hormones.** Cell 56:335-344.

Biggins J. A., Perry E. K., McDermott J. R., Smith I. A., Perry R. H., y Edwardson J. A. 1983. **Postmortem levels of thyrotropin-releasing hormone and neurotensin in the amygdala in Alzheimer's disease, schizophrenia and depression.** J. Neurol. Sci. 58: 117.

Blazer D. G., Kessler R. C., McGonagle K. A., y Swartz M. S. 1994. **The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: The National Comorbidity Survey.** Am. J. Psychiatry 151:979-986.

Boler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C. Y., y Shally A. V. 1969. **The identify of chemical and hormonal properties of the thyrotropin-releasing hormone and pyroglutamyl-histidil-proline amide.** Biochem. Biophys. Res. Commun 37:705-710.

Boswell E. B., Anfinson T. H., y Nemeroff C. B. 1997. **Depression associated with endocrine disorders.** In: Robertson M. M., y Katona C. L. Ed. Depression and physical illness. Inglaterra: Wiley, Chichester. Pp 256-292.

Bremner J. D., Randall P., Scott T. M., Bronen R. A., Seybyl J. P., Southwick s. m., Delaney R. C., McCarthy G., Charney D.S., y Innis R. B. 1995. **MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder.** Am. J. Psychol. 152:973-981.

Bremner J. D. 1999. **Does stress damage the brain?.** Biol Psychiatry 45:797-805.

Brooks B. R., Kalin N., Beaulieu D. A., Barksdale C., Sufit R. L., y Dills D. G. 1988. **Thyrotropin-releasing hormone uptake into serum and cerebrospinal fluid following intravenous or subcutaneous administration.** Neurol. Res. 10:236-238.

Brown E. S., Rush A. J., y McEwen B. S. 1999. **Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders.** Neuropsychopharmacology 21: 474-484.

Browne P., y O' Cuinn G. 1983. **An evaluation of the role a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin in vitro.** Eur. J. Biochem. 137:75-87.

Bruhn T. O., Rondeel J. M., y Jackson I. M. 1998. **Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. IV. Evidence for paracrine and autocrine regulation.** *Endocrinology* 139: 3416-3422.

Brunello N., y Cheney D. L. 1981. **The septo-hippocampal cholinergic pathway: role of antagonism of pentobarbital anesthesia and regulation by various afferents.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219:489-495.

Bunney W. E., y Davis J. 1965. **Norepinephrine in depressive reactions: a review.** *Arch. Gen. Psychiatry* 13:483-494.

Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Vale W., y Guillemin R. 1969. **Derives polypeptidiques de syntheses doues d'activite hypophysiotrope TRF.** *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 269:1870-1873.

Burgus R., y Guillemin R. 1970. **Hypothalamic releasing factors.** *Annu. Rev. Biochem.* 39:499.

Burmeister M. 1999. **Basic concepts in the study of diseases with complex genetics.** *Biol. Psychiatry* 45:522-532.

Burt D. R., y Snyder S. H., 1975. **Thyrotropin-releasing hormone (TRH): apparent receptor binding in rat membranes.** *Brain Res.* 93:309-328.

Callahan A. M., Frye M. A., Marangell L. B., George M. S., Ketter T. A., L'Herrou T., y Post R. M. 1997. **Comparative antidepressant effects of intravenous and intrathecal thyrotropin-releasing hormone: effects of tolerance and implications for therapeutics.** *Biol. Psychiatry* 41:264-272.

Cao J., O'Donell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lembo P., Ahmad S., y Walker P. 1998. **Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor.** *J. Biol. Chem.* 273: 3281-3287.

Caraveo-Anduaga J., Colmenares E., y Saldívar G. 1999. **Estudio clínico-epidemiológico de los trastornos depresivos.** *Salud Mental* 22:7-17.

Carpenter W., y Bunney W. 1971. **Adrenal cortical activity in depressive illness.** *Am. J. Psychiatry* 128:31-36.

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

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

Cintra A., Fuxe K., Wikstrom A. C., Visser T., y Gustafsson J. A. 1990. **Evidence for thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in various preoptic and hypothalamic nuclei of the male rat.** Brain Res. 506:139-144.

Charney D. S. 1995. **Noradrenergic neural substrates for anxiety and fear.** In: Bloom F. E., Kupfer D. J. (Eds.). Psychopharmacology: The Fourth generation of progress. Raven Press, New York pp 387-395.

Choi Y., Hartzell D., Azain M., y Baile C. 2002. **TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats.** Physiology & Behavior 7:1-4.

Contreras C. M., Lara-Morales H., Molina-Hernández M., Saavedra M., y Arrellin-Rosas G. 1995. **An early lesion of the lateral septal nuclei produces changes in the forced swim test depending on gender.** Prog. in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 19:1277-1284.

Contreras C. M., Chacón L., Rodríguez-Landa F. J., Bernal-Morales B., Gutiérrez-García A., y Saavedra M. 2004. **Spontaneous firing rate of lateral septal neurons decreases after forced swimming test in Wistar rat.** Prog. in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 28:343-348.

Coppen A. 1967. **The biochemistry of affective disorders.** Br. J. Psychiatry 113: 1237-1264.

Coppen A. Montgomery S., y Peet M., 1974. **Thyrotropin-releasing hormone in the treatment of depression.** Lancet i:433-435.

Covarrubias L., Redondo J. L., Vargas M. A., Uribe R. M., Méndez M., Joseph-Bravo P., y Charli J. L. 1994. **In vitro TRH release from hypothalamus slices varies during the diurnal cycle.** Neurochem. Res. 19:845-850.

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

Damasio A. R., Tranel D., y Damasio H. 1990. **Individuals with sociopathic behavior caused by frontal damage fail to respond autonomically to social stimuli.** Behav. Brain Res. 41:81-94.

de Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérez-Martínez L., y Joseph-Bravo P. 2000. **Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain.** Neurochemistry International 37:483-496.

De La Pena P., Delgado L. Del Camino D., y Barros F. 1992. **Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH₃ rat anterior pituitary cells.** Biochem. J. 284:891-899.

Diamond D. M., Campbella A., Park C. R., y Vouimba R. M. 2004. **Preclinical research on stress, memory, and the brain in the development of pharmacotherapy for depression.** Eur. Neuropsychopharmacol. 14:491-495.

Dinan T. G. 2001. **Psyconeuroendocrinology of mood disorders.** Curr. Opin. Psychiatry 14:51-55.

Drevets W. C., Videen T. O., Price J. L., Preskorn S. H., Carmichael S. T., y Raichle M. E. 1992. **A functional anatomical study of unipolar depression.** J. Neurosci. 12:3628-3641.

Drevets W. C., Simpson J. R., y Raichle M. E. 1995. **Reciprocal supression of regional cerebral blood flow during emotional versus higher cognitive processes: Implications for interactions between emotion and cognition.** Cog. Emotion. 12:353-385.

Drevets W. C., Gadde K., y Krishnan R. 1999. **Neuroimaging studies of depression.** En: Charney D. S., Nestler E. J., Bunney B. J. Neurobiology of Mental Illness. Nueva York. Oxford University Press. pp 394-418.

Drossopoulou G., Antoniou K., Kitraki E., Papathanasiou G., Papalexi E., Dalla C., y Papadopoulou-Daifoti Z. 2004. **Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats.** Neuroscience 126:849-857.

Duman R. S., Heninger G. R., y Nestler E. J. 1997. **A molecular and cellular theory of depression.** Arch. Gen. Psychiatry 54:597-606.

Duman R. S. 1999. **The neurochemistry of mood disorders: preclinical studies.** En: Charney D. S., Nestler E. J., Bunney B. J. Neurobiology of Mental Illness. Nueva York. Oxford University Press. pp 333-345.

Duncan G. E., Breese G. R., Criswell H. Stumpf W. E., Mueller R. A., y Covey J. B. 1986. **Effects of antidepressant drugs injected into the amygdala on behavioral responses of rats in the forced swim test.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 238:758-762.

Doolittle R. F., y Armentrout R. W. 1968. **Pyrrolidonyl peptidase: an enzyme for selective removal of pyrrolidone-carboxylic acid residues from polypeptides.** Biochemistry 7:516-521.

Ehrensing R. H., Kastin A. J., Schalch D. S., Friesen H. G., Vargas J. R., y Schally A. V. 1974. **Affective state and thyrotropin and prolactin responses after repeated injections of thyrotropin-releasing hormone in depressed patients.** Am J. Psychiatry 131: 714-718.

Espósito S., Prange A. J., y Golden R. N. 1997. **The thyroid axis and mood disorders: Overview and future prospects.** Psychopharmacology Bulletin 3:205-217.

Estrada-Camarena E., Contreras C. M., Saavedra M., Luna-Baltazar I., López-Rubalcava C. 2002. **Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST).** *Behav. Brain Res.* 134:175-183.

Fleischer N., y Guillemin R. 1976. **Mammalian TRH.** En: Parson J. Peptide hormones. Macmillan. Nueva York. pp 317-335.

Fujino K., Yoshitake T., Inoue O., Ibi N., Kehr J., Ishida J., Nohta H., Yamaguchi M. 2002. **Increased serotonin release in mice frontal cortex and hippocampus induced by acute physiological stressors.** *Neurosci. Lett.* 320:91-95.

Gage F. H. 2000. **Structural Plasticity: cause, result, or correlate of depression.** *Biol. Psychiatry* 48: 713-714.

Garat B., Miranda J., Charli J. L., y Joseph-Bravo P. 1985. **Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyroliberin releasing hormone in rat brain.** *Neuropeptides.* 6:27-40.

Gary K. A., Sevarino K. A., Yarbrough G. G., Prange A. J. y Winokur A. 2003. **The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics.** *J. Pharm. Exp. Ther.* 305:410-416.

Giovannini M. G., Casamenti F., Nistri A., Paoli F., y Pepeu G. 1991. **Effect of thyrotropin-releasing (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis.** *Br. J. Pharmacol.* 102:363-368.

Glowinski J., Tassin J. P., Blanc G., y Thierry A. M. 1977. **The mesocortical dopaminergic systems.** In: Mason G. (Ed.) *Rhinencephale, Neurotransmetteurs et Psychoses* pp 135-147.

Gogate M. G., Bird S. V., Wingkar K. C., y Kantak N. M. 1995. **Septal regulation of male sexual behavior in rats.** *Physiol. Beh.* 57:1205-1207.

Gorka Z., Ossowska K., y Stach R. 1979. **The effect of unilateral amygdala lesion on the imipramine action in behavioural despair in rats.** *J. Pharm. Pharmacol.* 31:647-648.

Goto Y., y O'Donnell P. 2002. **Timing-dependent limbic-motor synaptic integration in the nucleus accumbens.** *Neuroscience* 99:13189-13193.

Gray T. S., Carney M. E., y Magnuson D. J. 1989. **Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release.** *Neuroendocrinology* 50:433-446.

Griffiths E. C. 1985. **Thyrotropin releasing hormone: endocrine and central effects.** *Psychoneuroendocrinology* 10:225-235.

Griffiths E. C. 1986. **Thyrotropin releasing hormone, new applications in the clinic.** Nature 322:212-213.

Grosvenor C. E., y 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: 863-968.

Haisenleder D. J., Orotlano G. A., Dalkin A. C., y Marschall J. C. 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.

Hamilton M. 1960. **A rating scale for depression.** J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 23:56-62.

Henn F A., y McKinney W. T. 1987. **Animal models in psychiatry.** Psychopharmacology. En: Meltzer H. Y. The third generation of progress. Raven Press. Nueva York. pp 697-704.

Heuer H., Schafer M. K., O'Donnell D., Walker P., y Bauer K. 2000. **Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats.** J. Comp. Neurol. 428: 319-336.

Hokfelt T., Tsuruo Y., Ulfhake B., Culheim S., Arvidsson U., Foster G. A., Schultzberg M., Schalling M., Arborelius M., Freedman J., Post C., y Visser T. 1989. **Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds.** Ann. NY. Acad. Sci. 553:76-105.

Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E. Cohen O., y Wondisford F. E. 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.

Hollister L., Berger P., Ogle F., Arnold F., y Johnson A. 1974. **Protirelin (TRH) in depression.** Arch. Gen. Psychiatry 31:468-470.

Horita A., Carino M. A., Zabawska J., y Lai H. 1989. **TRH-analog MK-771 reverse neurochemical and learning deficits in medial septal-lesioned rats.** Peptides 10:121-124.

Huxley N. A., Parikh S. V., y Baldessarini R. J. 2000. **Effectiveness of psychosocial treatments in bipolar disorder: state of the evidence.** Harv. Rev. Psychiatry 8:126-140.

Imperato A. Angellucci L., Cassolini P., Zocchi A., y Puglisi-Allegra S. 1992. **Repeated stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress.** Brain Res. 577:194-199.

Ishikawa K., Taniguchi Y., Kurosumi K., y Suzuki M. 1986. **Origin of septal thyrotropin-releasing hormone in the rat.** Neuroendocrinology 44:54.

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

Jackson M. D., y Asamoah E. O. 1999. **Thyroid function in clinical depression: insights and uncertainties.** *Thyroid Today* 22:1-11.

Jaffe E. H., De Frias V., y Ibarra C. 1993. **Changes in basal and stimulated releasing of endogenous serotonin from different nuclei of rats subjected to two models of depression.** *Neurosci Lett.* 162:157-160.

James C., Garbutt M. D., James P., Mayo M. D., Karley Y., Little M. D., Gregory M., Gillette M. D., George A., Mason P. D., Bess D., Prange A. J. JR. 1994. **Dose-response studies with protirelin.** *Arch. Gen. Psychiatry.* 51:875-883.

Jaworska-Feil L., Budziszewska B., y Lason W. 1997. **Effects of repeated cocaine administration on the thyrotropin-releasing hormone level and receptors in the rat brain.** *Neuropeptides* 31:253-258.

Jesberger J. A., y Richardson J. S. 1985. **Animal models of depression: parallels and correlates to severe depression in humans.** *Biol. Psychiatry* 20:764.

Jordan S., Kramer G. L., Zukas P. K., y Petty F. 1994. **Previous stress increases in vivo biogenic amine response to swing stress.** *Neurochem Res.* 19:1521-1525.

Joseph-Bravo P., Uribe R. M., Vargas M. A., Pérez-Martínez L., Zoeller T., y Charli J. L. 1998. **Multifactorial modulation of TRH metabolism.** *Cellular Molecular Neurobiology.* 18:231-247.

Kakucska I., Qui Y., y Lechan R. M. 1995. **Changes in adrenal status affect hypothalamic TRH gene expression in parallel with CRH.** *Endocrinology* 136:2795-2808.

Kalivas P. W., Simasko S. M., y Horita A. 1981. **Effect of septohippocampal lesions on thyrotropin-releasing hormone antagonism of pentobarbital narcosis.** *Brain Res.* 222:253-265.

Kalivas P. W., Stanley D., y Prange JR. A. J. 1987. **Interaction between thyrotropin-releasing hormone and the mesolimbic dopamine system.** *Neuropharmacology* 26:33-38.

Kandel E. R., Schwartz J. H., y Jessell T. M. 2001. **Principios de neurociencia.** McGraw-Hill/Interamericana. España. pp 1209-1213.

Karandrea D., Kittas C., y Kitraki E. 2002. **Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors.** *Neuroendocrinology.* 75:217-226.

Kastin A. J., Ehrensing R. H., Schalch D. S., y Anderson M. S. 1972. **Improvement in mental depression with decreased thyrotropin response after administration of thyrotropin-releasing hormone.** *Lancet* ii:740-742.

Kelliher P., Connor T. J., Harkin A., Sanchez C., Kelly J. P., y Leonard B. E. 2000. **Varying response to the rat forced-swing test under diurnal and nocturnal conditions.** *Physiol Behav.* 69:531-539.

Kelly J. A. 1995. **Thyrotropin-releasing hormone: basis and potential for its therapeutic use.** *Essays Biochem.* 30:133-149.

Kirby L. G., y Lucki I. 1997. **Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 282:967-976.

Kiss A., Adameova ., Kubovcakova L., Jamal B., Bacova Z., Zorad S., Tybitanclova K., Kvetnansky R., y Strbak V. 2004. **Effect of immobilization on in vitro thyrotropin-releasing hormone release from brain septum in wild-type and corticotropin-releasing hormone knock-out mice.** *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1018:207-213.

Kjeiiman B. F., Beck-Friss J., Ljunggren J-G., y Wetterberg L. 1984. **Twenty-four-hour serum levels of TSH in affective disorders.** *Acta Psychiatr. Scand.* 69:491-502.

Koller K. J., Wolff R. S., Warden M. R., y Zoeller R. T. 1987. **Thyroid hormones regulates levels of thyrotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus.** *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 84:7329-7333.

Koob B. 1992. **Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways.** *Trends Neurosci.* 13:177-184.

Kraus R. P., Phoenix E., Edmonds M. W., Nicholson I. R. Chandarana P. C., y Tokmakejian S. 1997. **Exaggerated TSH responses to TRH in depressed patients with normal baseline TSH.** *J. Clin. Psychiatry* 58: 266-270.

Kubek M. J., y Sattin A. 1984. **Effect of electroconvulsive shock on the content of TRH in rat brain.** *Life Sci.* 34:1149-1152.

Kubek M. J., Knoblach S. M., Sharif N. A., Burt D. R., Buterbaugh G. G., y Fuson K. S. 1993. **TRH gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures.** *Ann. Neurol.* 33:70-76.

Kubek M. J., y Garg B. P. 2002. **Thyrotropin-releasing hormone in the treatment of intractable epilepsy.** *Pediatr. Neurol.* 26:9-17.

Lean A. D., Ferland L., Drouin J., Kelley P. A., y Labrie F. 1977. **modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones.** *Endocrinology* 100:1496-1504.

Lee S. I., Sterwart K., Goodman H. 1988. **Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone.** J. Biol. Chem. 263:16604-16609.

Lechan R. M., y Jackson I. M. D., 1982. **Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary.** Endocrinology 111:55-65.

Lechan R. M., Wu P., Jackson I. M. D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G., y Goodman R. M. 1986. **Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain.** Science 213:159-161.

Lechan R. M. 1993. **Update on thyrotropin-releasing hormone.** Thyroid today 16:1-11.

Lechan R. M., Toni R. 2000. **Thyrotropin-Releasing Hormone Neuronal systems in the central nervous system.** En: Nemeroff C. B. Neuroendocrinology. C. R. C. Press, Inc. USA. pp 279-330.

Lehtinen V., y Joukama A. 1994. **Epidemiology of depression: prevalence, risk factors and treatment situation.** Acta Psychiat. Scand. (supl) 377:7-10.

Leung L.S., Ma J., y McLachlan R. S. 2000. **Behaviors induced or disrupted by complex partial seizures.** Neuroscience and Biobehavioral Reviews 24:763-775.

Lighton C., Marsden C. A., Bennett G. W., Minchin M., y Green A. R. 1984 (b). **Decrease in levels of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) in the nucleus accumbens and lumbar spinal cord following repeated electroconvulsive shock.** Neuropharmacology 23:963-966.

Lighthon C., Bennet G. W., y Marsden C. A. 1985. **Increase in levels and ex vivo release of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in specific regions of the CNS of the rat by Chronic treatment with antidepressants.** Neuropharmacology. 24: 401-406.

Liposits. Z., Paull W. K., Wu P., Jackson I. M. D., y Lechan R. M. 1987. **Hypophysiotrophic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action.** Histochemistry 88: 1.

Lloyd R. L O., Pekary A. E., Sattin A., y Amundson T. 2001. **Antidepressant effects of thyrotropin-releasing hormone analogues using a rodent model of depression.** Pharmacol. Biochem Behav. 70:15-22.

Loosen P. T. 1985. **The TRH-induced TSH response in psychiatric patients: a possible neuroendocrine marker.** Psychoneuroendocrinology 10:237-260.

Lowry O. H. Rosenbrough A. L. Farr y Randall. 1951. **Protein measurement with folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193:265-275.

- Luo L., Bruhn T., y Jackson I. M. D. 1995. **Glucocorticoids stimulate thyrotropin releasing gene expression in cultural hypothalamic neurons.** *Endocrinology* 136:4945-4959.
- Magarinos A. M., McEwen B. S., Flugge G., y Fuchs E. 1996. **Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews.** *J. Neurosci.* 16:3534-3540.
- Magarinos A. M., Deslandes A. McEwen B. S. 1999. **Effects of antidepressant and benzodiazepine treatments on the dendritic structure of CA3 pyramidal neurons after chronic stress.** *Eur. J. Pharmacol.* 371:113-122.
- Manaker S., Eichen A., Winokur A., Rhodes C. H., y Rainbow T. C. 1986. **Autoradiographic localization of thyrotropin releasing hormone receptors in human brain.** *Neurology* 36:641-646.
- Marangell L. B., Callahan A., George M., Ketter T., Pazzaglia P., L'Herrou T., Leverich G. I., y Post R. M. 1997. **Effects of intrathecal thyrotropin-releasing hormone (TRH) in refractory depressed patients.** *Arch. Gen. Psychiatry* 54:214-222.
- Manji H. K., y Lenox H. R. 2000. **Signaling: cellular insights into pathophysiology of bipolar disorder.** *Biol. Psychiatry* 48:518-527.
- Matre V., Karlsen H., Wright M., Lundell I., Fjeldheim A., Gabrielsen O., Larhammar D., y Gautvik K. 1993. **Molecular cloning of a functional human thyrotropin-releasing hormone receptor.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:179-185.
- McKinney W. T. 1984. **Animal models of depression: an overview.** *Psychiatr. Dev.* 2:77.
- Metcalf G., Dettmar P. W., Lynn A. G., Brewster ., y Havler M. E. 1981. **Thyrotropin-releasing hormone (TRH) analogues show enhanced CNS selectivity because of increased biological stability.** *Regul. Pep.* 2:277-284.
- Miyamoto M., y Nagawa Y. 1977. **Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats.** *Eur. J. Pharmacol.* 44:143-152.
- Mogenson G. J., Jones D. L., y Yim C. Y. 1980. **From motivation to action: functional interface between limbic and motor systems.** *Prog. Neurobiol.* 14:69-97.
- Moriceau S., Roth T. L., Okotoghaide T., y Sullivan R. M. 2004. **Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups.** *Int. Dev. Neurosci.* 22:415-422.
- Morzorati S., y Kubek M. J. 1993. **Septal TRH in alcohol-naive P and NP rats and following alcohol challenge.** *Brain Res. Bull.* 31:301-304.

Nair R. M. G., Barrett J. F., Bowers C. Y., y Schally A. V., 1970. **Structure of porcine thyrotropin-releasing hormone.** *Biochemistry* 9:1103.

Nelson J. y Randy. 2000. **An introduction to behavioral endocrinology.** 2^a edición. Sinauer Associates, Inc. USA. pp 639-643.

Nemeroff C. B., Loosen P. T., Bissett G. 1978. **Pharmaco-behavioral effects of hypothalamic peptides in animals and man: focus on TRH and neurotensin.** *Psychoneuroendocrinology* 3:279-310.

Nemeroff C. B., Widerlov E., Bissette G., Walleus H., Karlsson I., Ekluno K., Kilts C. D., Loosen P. T., y Vale W. 1984. **Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients.** *Science* 226:1342- 1344.

Nemeroff C. B. 1989. **Clinical significance of psychoneuroendocrinology in psychiatry: focus on the thyroid and adrenal.** *J. Clin. Psychiatry* 50:13-20.

Nestler E. J., Barrot M., Dileone R. J., Amelia J. E., Gold S., y Monteggia L. M. 2002. **Neurobiology of depression.** *Neuron*. 34:13-25.

Nillni E. A., Friedman T. C., Todd R. B., Birch N. P., Loh Y. P., y Jackson I. M. D. 1995. **Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinat PC1.** *J. Neurochem.* 65:2462-2472.

Nillni E. A., Leiter E. H., y Wetsel W. C. 1997. **The mutation in carboxypeptidase E (CPE) in the fat/fat mouse is associated with a defect in processing the proTRH.** En: Minneapolis M. N. Program of the 79th Annual Meeting of the Endocrine Society. pp 203.

Nillni E. A., y Sevarino K. A. 1999. **The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone derived peptides.** *Endocrine Rev.* 20:599-648.

Nishino S. Arrigoni J., Shelton J., Kanbayashi T., Dement W. C., y Mignot E. 1997. **Effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogs on daytime sleepiness and cataplexy in canine narcolepsy.** *J. Neurosci.* 17:6401-6408.

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

O'Leary R., y O'Connor B. 1995. **Thyrotropin-releasing hormone.** *J. Neurochem.* 65:953-963.

Oswald S. 2000. **Funtional Neuroscience.** Springer. USA. pp 469-482.

Palkovits M., Brownstein M. 1988. **Maps and guide to microdissection of the rat brain.** Elsevier. Nueva York.

Pekary A. E., Meyerhoff J. L., Sattin A. 2000. **Electroconvulsive seizures modulate levels of thyrotropin releasing hormone and related peptides in rat hypothalamus, cingulated and lateral cerebellum.** Brain Res. 884:174-183.

Pérez-Martínez L., Carreón-Rodríguez A., González-Alzati M. E., Morales C., Charli J. L., y Joseph-Bravo P. 1998. **Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway.** Neuroendocrinology 68: 345-354.

Plotnikoff N. P., Prange A. J. Jr., Breese G. R., Anderson M. S., y Wilson I. C. 1972. **Thyrotropin-releasing hormone: enhancement of DOPA activity by a hypothalamic hormone.** Science 178:417-418.

Porsolt R. D., Bertin A., y Jalfre M. 1977a . **Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressant treatments.** Nature 229:327-336.

Porsolt R. D., LePichon M., y Jalfre M. 1977b. **Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments.** Nature 266:730-732.

Porsolt R. D., Anton G. Blavet N., y Jalfre M. 1978. **Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments.** Eur. J. Pharmacol. 47:379-391.

Post R. M., y Weiss S. R. 1992. **Endogenous biochemical abnormalities in affective illness: therapeutic versus pathogenic.** Biol. Psychiatry 32:469-484.

Prange A. J. Jr., Lara P. P., Wilson I. C., Alltop L. B., y Breese G. R.. 1972. **Effects of thyrotropin-releasing hormone in depression.** Lancet 2:999-1002.

Price J., Grossman A., Besser G. M., Rees L. H. 1983. **Dopaminergic control of the rat thyrotroph.** Neuroendocrinology 36:125-129.

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

Ricardo J. A., y Koh E. T. 1978. **Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat.** Brain Res. 153:1.

Rittenhouse A. P., López-Rubalcava C., Stanwoos D. G., y Lucki I. 2002. **Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat.** Psychoneuroendocrinology 27:303-318.

Robbins T. W., y Everitt B. J. 1995. **Central norepinephrine neurons and behavior.** In: Bloom F. E., Kupfer D. J. (Eds.), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress.* Raven Press, New York, pp 363-372.

Rogan M. T. y LeDoux J. 1996. **Emotion: systems, cells, synaptic plasticity.** *Cell* 85:469-475.

Ronan P. J., Steciuk M., Kramer G. L., Kram M., y Petty F. 2000. **Increased septal 5-HIAA efflux in rats that donot develop learned helplessness after inescapable stress.** *J. Neurosci Res.* 61:101-106.

Sapolsky R. M., Krey L. C., y McEwen B. S. 1984. **Stress down-regulates corticosterona receptors in a site-specific manner in the brain.** *Endocrinology* 114:287-292.

Sattin A., Hill T. G., Meyerhoff J. L., Norton J. A., y Kubek M. J. 1987. **The prolonged increase in thyrotropin-releasing hormone in rat limbic forebrain regions following electroconvulsive shock.** *Regul. Pept.* 19:13-22.

Sattin A., Pekary A. E., y Lloyd R. L. 1994. **TRH gene products are implicated in the antidepressant mechanisms of seizures.** *Ann N. Y. Acad. Sci.* 739:135-153.

Sattin A. 1999. **The role of TRH and related peptides in the mechanism of action of ECT.** *J. ECT.* 15:76-92.

Sattin A., Senanayake S. S., Pekary A. E. 2002. **Lithium modulates expression of TRH receptors and TRH-related peptides in rat brain.** *Neuroscience* 115:263-273.

Sawchenko P. E., Swanson L. W. 1982. **The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat.** *Brain Res. Rev.* 257: 275-325.

Segerson T. P., Kauer J., Wolfe H. C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I. M. D., y Lechan R. M. 1987. **Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus.** *Science* 238:78-80.

Sharp T., Bennett G. W., Marsden C. A., y Tulloch I. F. 1984. **A comparison of the locomotor effects induced by centrally-injected TRH and TRH analogues.** *Regul. Pept.* 9:305-315.

Shian L. R., Wu M. H., Lin M. T., y Ho L. T. 1985. **Hypothalamic involvement in the locomotor stimulant or satiefy action of thyrotropin-releasing hormone and amphetamine.** *Pharmacology* 30:259-265.

Schildkaut J. J. 1965. **The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence.** *Am. J. Psychiatry* 122:509-522.

Sheehan T. P., Chambers R. A., y Russell D. S. 2004. **Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry.** Brain Res. Brain. Rev. 46:71-117.

Shioda S., Nakai Y., Sato A., Sunayama S., y Shimoda Y. 1986. **Electron-microscopic cytochemistry of the catecholaminergic innervation of TRH neurons in the rat hypothalamus.** Cell. Tissue Res. 245:247.

Smelik P. G. 1987. **Adaptation and brain function.** Prog. Brain Res. 72:3-9.

Sousa R. J., Tannery N. H., y Lafer E. M. 1989. **In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain.** Molecular Endocrinology 3:481-494.

Stemmelin J., Lukovic L., Salome N., y Griebel G. 2005. **Evidence that the lateral septum is involved in the antidepressant-like effects of the vasopressin V (1b) receptor antagonist, SSR149415.** Neuropsychopharmacology 30:35-42.

Strand F. L. 1999. **Neuropeptides: regulators of physiological processes.** MIT Press. Cambridge, Massachusetts. pp 179-185.

Straub R., Frech G., Joho R., y Gershengorn M. 1990. **Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:9514-9518.

Suzuki T., Kohno H., Sakurada T., Tadano T., y Kisara K. 1982. **Intracranial injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH) suppresses starvation-induced feeding and drinking in rats.** Pharmacol. Biochem. Behav. 17:249-253.

Tafet E. y Bernardini R. 2003. **Psychoneuroendocrinological links between chronic stress and depression.** Prog. in Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry 27:893-903.

Takayama H., Ota Z., y Ogawa N. 1986. **Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system.** Regul. Pept. 15:239-248.

Taylor W. L., y Dixon J. E. 1978. **Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone.** J. Biol. Chem. 253:6934-6940.

Thomas E. 1988. **Forebrain mechanism in the relief of fear. The role of lateral septum.** Psychobiology 16:36-44.

Toni R., y Lechan R. M. 1993. **Neuroendocrine regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the tuberoinfundibular system.** J. Endocrinol. Invest. 16:715-753.

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

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

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

Vogel R., Frye G., Wilson J., Kuhn C., Mailman R., y Breese G. 1980. **Attenuation of the effect of punishment by thyrotropin releasing hormone: comparisons with chlordiazepoxide.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212:153-161.

Vyas A., Pillai A. G., y Chattarji S. 2004. **Recovery after chronic stress fails to reverse amygdaloid neuronal hypertrophy and enhanced anxiety-like behavior.** *Neuroscience* 128:667-673.

Webster M. J., Knable M. B., O'Grady J., Orthmann J., y Weickert C. S. 2002. **Regional specificity of brain glucocorticoid receptor mRNA alterations in subjects with schizophrenia and mood disorders.** *Mol. Psychiatry* 7:985-994.

Willner P. 1984. **The validity of animal models of depression.** *Psychopharmacology* 83:1.

Willner P. 1986. **Validating criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case.** *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 10:677.

Willner P. 1990. **Animal models of depression: an overview.** *Pharmacol. Ther.* 45:425.

Winokur A., y Utiger R. D., 1974. **Thyrotropin-releasing hormone: regional distribution in rat brain.** *Science* 185:265-267.

Yamada M., Radovick S., Wondisford R. E., Nakayama Y., Weingraub B. D., y Wilber J. F. 1990. **Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing-hormone.** *Mol. Endocrinol.* 4:551-556.

Yoshitake T., Wang F. H., Kuteeva E., Holmberg K., Yamaguchi M., Crawley J. N., Steiner R., Bartfai T., Ogren S. O., Hokfelt T., y Kehr J. 2004. **Enhanced hippocampal noradrenaline and serotonin release in galanin-overexpressing mice after repeated forced swimming test.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:354-359.

Zandío M. Ferrín M., y Cuesta M. J. 2002. **Neurobiología de la depresión.** *Anales Sis. San Navarra* 25(supl. 3):43-62.

Zangen A., Nakash R., Overstreet D. H., y Yadid G. 2001. **Association between depressive behavior and absence of serotonin-dopamine interaction in the nucleus accumbens.** *Psychopharmacology* 155:434-439.

Zigmond M. J., Bloom F. E., Landis S. C., Roberts J. L., y Squire L. R. 1999. **Fundamental neuroscience.** Academic Press. San Diego, California. pp 1130-1141.

Zigmons M. J., Spitzer N. C., Roberts J. L., McConnell S. K., Bloom F. E., y Squire L. R. 2003. **Fundamental neuroscience.** 2ª edición. Academic Press. USA. pp 1031-1039.

Zoeller R. T., Kaber N., y Albers H. E. 1990. **Cold exposure elevates cellular levels of mRNA encoding TRH in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones.** *Endocrinology* 127:2955-2962.

ANEXO 1

Buffer RIA para el TRH: amortiguador de fosfatos 50mM pH 7.5 + BSA al 0.25% + 150mM de NaCl.

Solución E: 9ml Na_2CO_3 + 1ml tartrato de Na y K al 2% ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ Baker Analyzer) + 1ml CuSO_4 al 1%.

Buffer diluyente de esteroides: amortiguador de fosfatos 50mM pH 7.5 + 150mM de NaCl.

Corticosterona tritiada: 1 μl de ^3H -Cor + 9ml de buffer diluyente de esteroides \approx 10000 cpm/100 μl .

Buffer RIA para TSH: amortiguador de fosfatos 50mM pH 7.5 + 150mM NaCl +BSA al 0.25% + 50mM EDTA.

Anticuerpo contra TSH: 1 μl Ab (1:125) en 3000 μl de buffer RIA.

Buffer de fosfatos: amortiguador de fosfatos 50mM pH 7.5 + 150mM NaCl.

ANEXO 2

Análisis de la conducta de inmovilidad en las ratas sometidas al nado forzado

Pre-pru 30	In. 5'	In. 10'	In. 15'	Media	Pre-pru 24	In. 5'	In. 10'	In. 15'	Media
1	29	47	47	41	1	22	45	55	41
2	29	40	22	30	2	25	40	15	27
3	43	50	55	49	3	29	32	39	33
4	36	45	14	32	4	35	36	31	34
5	35	48	36	40	5	33	38	41	37
6	17	46	25	29	6	24	38	28	30
7	37	50	47	45	7	23	43	51	39
8	45	60	53	53	8	27	40	48	38
9	15	33	31	26	9	19	41	36	32
10	28	44	36	36	10	31	49	34	38
M	31	46	37	38	M	27	40	38	35
St	10	7	14	9	St	5	5	12	4
ESM	3	2	4	3	ESM	2	1	3	1

Continuación

Pre-pru eba	In. 5'	In. 10'	In. 15'	Media	Prueba	In. 5'	In. 10'	In. 15'	Media
1	31	40	40	37	1	44	47	33	41
2	26	29	25	27	2	38	52	50	47
3	27	15	18	43	3	36	36	28	33
4	32	56	42	43	4	34	52	29	38
5	45	40	46	44	5	20	50	50	40
6	31	54	53	16	6	14	52	48	38
7	37	24	16	26	7	40	49	36	41
8	38	56	50	48	8	19	47	42	36
9	36	45	46	42	9	12	46	47	35
10	42	56	57	51	10	49	54	58	54
M	34	41	39	40	M	31	48	42	40
St	6	15	14	8	St	13	5	10	6
ESM	2	5	5	3	ESM	4	2	3	2